

Jaime Moreira Pires

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NO
PERÍODO NEONATAL SOBRE O CEREBELO NA VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2019

Jaime Moreira Pires

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NO
PERÍODO NEONATAL SOBRE O CEREBELO NA VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eugenio A. M. Mello

Coorientadora: Dra. Maira Licia Foresti

São Paulo
2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Moreira Pires, Jaime

Avaliação dos efeitos da inflamação sistêmica no período neonatal sobre o cerebelo na vida adulta / Jaime Moreira Pires. - São Paulo, 2019.
xvi, 71f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Neurologia e Neurociências.

Título em inglês: Evaluation of the effects of systemic inflammation in the neonatal period on the cerebellum in adult life.

1. Cerebelo. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Período neonatal. 4. Inflamação. 5. Sequela.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA E NEUROCIÊNCIAS

Chefe do Departamento: Profa. Dra. *Maria do Carmo Pinho Franco*

Coordenador (a) do curso de pós-graduação: Profa. Dra. *Celia Harumi Tengan*

Jaime Moreira Pires

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NO
PERÍODO NEONATAL SOBRE O CEREBELO NA VIDA ADULTA**

Banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Maria Martha Bernardi

Prof.(a) Dr.(a) Beatriz de Oliveira Monteiro

Dr.(a) Simone Ribeiro Bittencourt

Prof.(a) Dr.(a) Aldo Bolten Lucion (suplente)

Aprovada em 29/08/2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“The brain is a world consisting of a number of unexplored continents and great stretches of unknown territory.”

Santiago Ramón y Cajal

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

José de Alencar

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, minha irmã, e minha esposa, pessoas estas fundamentais em todas as minhas conquistas, que em nenhum momento deixaram de acreditar que o sonho era possível, e fizeram-no torna-se realidade sonhando junto a mim.

Agradecimentos

“Eu te agradeço, Senhor, de todo o meu coração. Na presença dos anjos eu canto para ti.” (Sl 138,1). Agradeço a Deus por seu infinito amor, sua sabedoria e sua misericórdia, Tu és e sempre serás meu Senhor e meu Tudo. Obrigado Doce Mãe de Deus por me guardar e por tanto interceder por mim em todas as minhas jornadas.

Agradeço infinitamente aos meus pais, que dedicam tanto de suas vidas a mim, agradeço pela atenção, carinho, paciência, compreensão, por toda força, apoio, confiança, por serem meus maiores exemplos de vida, e principalmente por todo amor que me dão. Agradeço à minha irmã por todo carinho e por nossa grande amizade, amizade que nos une e que nos torna verdadeiros irmãos, independente de tudo. O meu agradecimento também à toda minha família e amigos que sempre, de alguma forma estiveram comigo me incentivando, ajudando e torcendo por mim. Agradeço à minha amada esposa, por todo amor dedicado a mim, por sua atenção, compreensão, incentivos, por seus cuidados, seus conselhos e por vezes suas exortações, obrigado Mariana, saiba que também há muito de você na realização desse sonho.

Meus sinceros agradecimentos a todos os amigos e irmãos da Família MUR e também do Grupo de Oração Caminhando com Cristo, a amizade e intercessão de todos vocês sempre foram e continuarão sendo preciosas.

Agradeço de forma muito especial ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Eugênio Mello e à minha coorientadora Dr^a. Maira Licia Foresti, pela total dedicação, disponibilidade, paciência e pelos grandes ensinamentos que recebi durante essa jornada, agradeço também à Prof^a. Dr^a. Ana Teresa Leslie pela ajuda fundamental no começo dessa trajetória, a vocês o meu Muito Obrigado!

Obrigado a todos os colegas do laboratório pela valorosa amizade, em especial Clivandir, Débora, Michele, Amanda Mosini, Amanda Arnaut, Thabatta, Fernando e Alessandro, vocês se tornaram parte fundamental ao longo dessa caminhada.

E agradeço de forma particular a todos que, mesmo não citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão de mais essa etapa na minha vida. MUITO OBRIGADO!!!

Sumário

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
1.1 Desenvolvimento do sistema nervoso central	1
1.2 Desenvolvimento cerebelar	4
1.2.1 Anatomia cerebelar	7
1.2.2 Histologia cerebelar	8
1.3 Neuroinflamação	12
1.4 Estresse oxidativo e suas consequências no SNC	14
1.5 Prematuridade e sua repercussão sobre o cerebelo.....	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. METODOLOGIA	20
3.1. Animais experimentais	20
3.1.1. Grupos experimentais e administração das soluções.....	22
3.1.2. Monitoramento dos animais	23
3.2. Avaliação comportamental - teste de Campo Aberto	23
3.3. Avaliação Histológica	25
3.3.1. Fixação do tecido – Perfusão.....	25
3.3.2. Corte dos encéfalos	26
3.3.3. Imunofluorescência para micróglia e células de Purkinje	26
3.3.4. Análise Estereológica	27
3.3.5. Histoquímica para estresse oxidativo	31
3.4. Análise de Expressão Gênica – TNF- α	32
3.4.1. Extração de tecido a fresco	32
3.4.2. Isolamento de RNA.....	33
3.4.3. Síntese de cDNA	34
3.4.4. Amplificação dos genes de interesse.....	34
3.4.5. PCR quantitativa (qPCR)	35

3.5. Análise estatística	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Avaliação da Mortalidade	36
4.2. Avaliação da Massa corporal	5
4.3. Avaliação Comportamental	38
4.4. Quantificação de micróglia e células de Purkinje	38
4.5. Avaliação do estresse oxidativo	42
4.6. Análise de Expressão Gênica - TNF- α	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS.....	57
8. ANEXO.....	71

Lista de Figuras

Figura 1- Desenvolvimento do sistema nervoso central	2
Figura 2 - Comparação temporal do desenvolvimento das células de Purkinje e células granulares no córtex cerebelar em ratos e humanos.	7
Figura 3 - Representação anatômica do cerebelo.....	8
Figura 4 - Citoarquitetura do córtex cerebelar.	9
Figura 5 - Circuito de aferência e eferência do córtex cerebelar	10
Figura 6 - Mecanismo de Neuroinflamação.	13
Figura 7 - Delineamento experimental.....	20
Figura 8 - Diferença anatômica em relação à distância anogenital entre filhotes fêmea e macho.....	21
Figura 9 - Aparato utilizado no teste do Campo Aberto	24
Figura 10 - Interface do software Stereo Investigator com representação da delimitação manual das regiões de interesse para contagem.....	28
Figura 11 - Interface do software Stereo Investigator com representação de Counting Frames e Grids no hemisfério direito do cerebelo.....	30
Figura 12 - Mortalidade dos filhotes nos diferentes grupos	36
Figura 13 - Variação da massa corporal nos diferentes dias pós-natal por grupo.....	5
Figura 14 - Densidade de células de Purkinje no hemisfério direito do cerebelo	40
Figura 15 - Fotomicrografia de células de Purkinje no hemisfério direito do cerebelo.....	41
Figura 16 - Fotomicrografia de células de micróglia, marcadas com Iba-1, no hemisfério direito do cerebelo nos diferentes grupos experimentais.....	42
Figura 17 - Densidade de células da micróglia no hemisfério direito do cerebelo	42
Figura 18 – Imagens de microscopia confocal da fluorescência do DAPI e da Etidina no lóbulo I do cerebelo	43
Figura 19 - Fluorescência relativa etidina/DAPI.....	44

Figura 20 - Expressão Relativa de RNAm para TNF- α no cerebelo	45
Figura 21 - Expressão Relativa de RNAm para TNF- α no hipocampo	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na análise estereológica.....	29
Tabela 2 - Sequências dos primers de TNF- α utilizados no PCR-real time	34
Tabela 3 - Grupos experimentais e número de animais utilizados para análises finais.....	5
Tabela 4 - Teste de campo aberto	38
Tabela 5 - Área e Volume das regiões de contagem das células de Purkinje	39
Tabela 6 - Área e Volume da região de contagem das células da micróglia.....	39

Lista de Abreviaturas

ApoER2, VLDLR e Dab1	Sítios de Ligação
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CCG	Camada de Células Granulares
cDNA	<i>complementary DNA</i> (DNA complementar)
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGE	Camada Germinal Externa
COX-2	Ciclo-Oxigenase 2
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (Limiar do Ciclo)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole (4', 6-Diamidino-2- Fenilindole)
DHE	Dihidroetidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
E	Dia Embrionário
EPM	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido-gama-amino-butírico
GSH	Glutationa Reduzida
H ₂ O	Fórmula química da água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Hprt	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase)
Iba1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IL1 β , 6, 8	Interleucina
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase indizível)
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl ₂	<i>Magnesium Chloride</i> (Cloreto de magnésio)
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)

NOX	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (NADPH Oxidase)
O ₂	Molécula de Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
OH [•]	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PB	Tampão Fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PN	Dia Pós-Natal
qPCR	Polymerase chain reaction quantitative real time (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RNA _m	RNA mensageiro
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Espécies Reativas do Nitrogênio)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas do Oxigênio)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SVZ	Sub-Ventricular Zone (Zona Sub-Ventricular)
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VZ	<i>Ventricular Zone</i> (Zona Ventricular)

Resumo

Objetivos: Avaliar os efeitos crônicos, no cerebelo, de um processo inflamatório sistêmico durante o período neonatal. **Metodologia:** Filhotes de ratos da cepa *Wistar norvegicus* (machos) foram distribuídos nos grupos experimentais NAIVE, SHAM e LPS. Os animais tratados receberam solução de cloreto de sódio a 0,9% ou lipopolissacarídeo via intraperitoneal nos dias pós-natais um, três, cinco e sete. No dia pós-natal 84, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora. No dia pós-natal 89, uma parte dos animais foi perfundida com fixador, e os cerebelos foram processados para imunofluorescência para células de Purkinje e micróglia, e para reação com etidina para detecção do ânion superóxido e avaliação do estresse oxidativo. Uma outra parte dos animais foi eutanasiada por decapitação, para avaliar alterações no nível de expressão da citocina inflamatória TNF- α no cerebelo e hipocampo. **Resultados:** Animais expostos à inflamação sistêmica neonatal (grupo LPS) apresentaram maior densidade de células da micróglia e maior produção de ânion superóxido na fase adulta quando comparados com os dos grupos controles (grupos NAIVE e SHAM). Não foram encontradas diferenças significativas em relação a atividade locomotora, densidade de células de Purkinje e expressão de TNF- α . **Conclusão:** A exposição a processos inflamatórios sistêmicos na fase neonatal pode ter efeitos crônicos no cerebelo. Por ser uma importante estrutura para funções motoras, executivas e também funções cognitivas e emocionais, estudos adicionais são essenciais para compreender os mecanismos pelos quais injúrias no período neonatal podem acarretar alterações que perduram ao longo da vida.

Palavras-chave: Cerebelo. Lipopolissacarídeo. Período neonatal. Inflamação. Sequela.

Abstract

Objectives: To evaluate the chronic effects of a systemic inflammatory process in the cerebellum during the neonatal period. **Methodology:** *Wistar norvegicus* (male) rat pups were distributed in the NAIVE, SHAM and LPS groups. Treated animals received either sodium chloride 0.9% or lipopolysaccharide solution intraperitoneally on the first, third, fifth and seventh postnatal days. On the postnatal day 84, the animals were submitted to the open field test to evaluate the locomotor activity. On postnatal day 89, some animals were perfused with fixative, and the cerebellum was processed for Purkinje and microglia cells immunofluorescence, and for ethidine histochemistry for the detection of superoxide anion and evaluation of oxidative stress. Other animals were euthanized by decapitation, to evaluate expression of the inflammatory cytokine TNF- α in the cerebellum and hippocampus. **Results:** Animals exposed to neonatal systemic inflammation (LPS group) had higher density of microglia cells and greater superoxide anion production in the adult phase when compared to the control groups (NAIVE and SHAM groups). No significant differences were found regarding locomotor activity, Purkinje cell density and TNF- α expression. **Conclusion:** Exposure to systemic inflammatory processes in the neonatal phase may have chronic effects on the cerebellum. Being an important structure for motor, executive, as well as cognitive and emotional functions, further studies are necessary to understand the mechanisms by which injuries in the neonatal period can result in changes last through life.

Keywords: Cerebellum. Lipopolysaccharide. Neonatal period. Inflammation. Sequela.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento do sistema nervoso central

O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) envolve a coordenação de inúmeros processos tais como proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e morte¹. Esses processos são iniciados durante o desenvolvimento embrionário e perduram até a terceira década de vida, formando um sistema altamente especializado e complexo.

O SNC humano começa a se desenvolver por volta da terceira semana gestacional com o início dos processos de neurulação (primária e secundária), os quais resultam na formação do tubo neural a partir do ectoderme embrionário^{2,3}. No final da quarta semana de gestação o tubo neural cresce e se dobra, formando uma estrutura composta por três dilatações conhecidas como vesículas encefálicas primitivas, são elas: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo (Figura 1)^{4,5}.

Ao longo da quinta semana de gestação, o prosencéfalo (vesícula de posição rostral) se expande e dá origem ao telencéfalo e ao diencéfalo; o mesencéfalo (vesícula de posição mediana) não se divide; e o rombencéfalo (vesícula de posição caudal) se expande e dá origem ao metencéfalo e ao mielencéfalo, resultando em cinco vesículas secundárias (Figura 1)⁴⁻⁶.

No decorrer da gestação, as vesículas secundárias se modificam e dão origem às estruturas características do encéfalo. O telencéfalo dá origem aos dois hemisférios cerebrais, os quais contêm o sistema olfatório, o corpo estriado, uma camada superficial de substância cinzenta (o córtex cerebral) e uma camada medular de substância branca. O diencéfalo dá origem ao tálamo, epitálamo, hipotálamo e subtálamo. O mesencéfalo origina o teto, o tegumento e os pedúnculos cerebrais. O metencéfalo origina a ponte e o cerebelo, enquanto o mielencéfalo dá origem ao bulbo (Figura 1)^{4,7}.

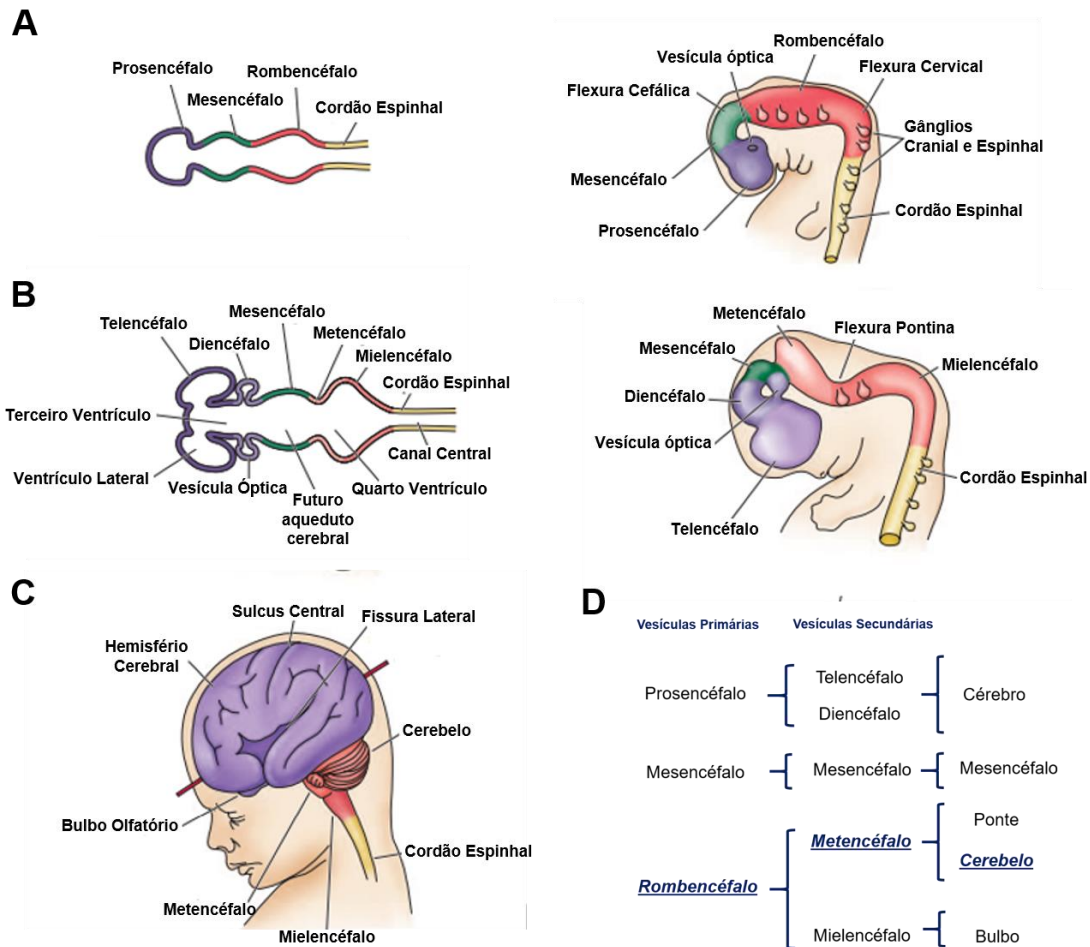


Figura 1- Desenvolvimento do sistema nervoso central. O sistema nervoso tem origem na formação do tubo neural a partir do ectoderme embrionário. **(A)** O neuroepitélio do tubo neural começa a se subdividir e forma as diferentes vesículas primárias: prosencephalo, mesencephalo, rombencephalo. **(B)** As vesículas primárias se subdividem em vesículas secundárias: telencephalo, diencéfalo, mesencephalo, metencephalo e mielencefalo **(C)** A proliferação e as especializações do neuroepitélio são etapas fundamentais para o amadurecimento das vesículas e formação das diferentes estruturas encefálicas com todas as suas particularidades. **(D)** Resumo da formação de diferentes estruturas encefálicas a partir das vesículas primárias. Em destaque, a origem embrionária do cerebelo a partir do rombencephalo e metencephalo, vesículas primária e secundária, respectivamente (Fonte: Adaptado de PURVES et al.)⁸.

Além da formação das vesículas primárias e secundárias, o tubo neural é modelado ao longo do eixo dorsal-ventral estabelecendo compartimentos definidos de células progenitoras³. Células neuroepiteliais presentes na zona ventricular (VZ) do tubo neural, atuam como células-tronco e/ou progenitores para os neurônios e a macroglia (isto é, astrócitos e oligodendrócitos). A partir da sétima semana gestacional são formados os primeiros neurônios corticais. Neste período, outro compartimento neurogênico, chamado de zona subventricular (SVZ) aparece acima da VZ, ampliando a neurogênese. Os neurônios formados nessas regiões são imaturos e migram dentro do SNC para formar diferentes estruturas encefálicas^{2,6,9}.

A grande maioria dos neurônios do telencéfalo humano é gerada antes do nascimento. A formação dos neurônios excitatórios do córtex cerebral, por exemplo, termina em torno da vigésima sétima semana gestacional^{10,11}. Entretanto, interneurônios cerebrais corticais adicionais, neurônios do giro denteado e os interneurônios do corpo estriado são formados após este período, prolongando-se além do nascimento em algumas regiões, sobretudo no neocórtex e cerebelo^{12,13}.

O desenvolvimento dendrítico e axonal, seguido pela formação de sinapses e mielinização de axônios são características celulares chave associadas à maturação funcional do SNC^{14,15}. Embora menos intensas do que são no período pré-natal e no início do desenvolvimento pós-natal, mudanças estruturais e reorganização molecular dos circuitos neurais continuam ao longo da infância e adolescência.

A formação de células gliais geralmente segue a neurogênese e tem pico próximo ao nascimento, sendo também um processo que se prolonga no período pós-natal em humanos. As células precursoras de astrócitos e de oligodendrócitos são formadas a partir de células da glia radial, um tipo de célula-tronco oriunda das células neuroepiteliais da VZ e da SVZ e que aparecem por volta da sétima semana gestacional¹⁶⁻¹⁹.

As células gliais têm função essencial como progenitores neurais, tanto ao longo do desenvolvimento quanto no indivíduo adulto¹⁶. Os oligodendrócitos, embora sejam formados precocemente, começam a desempenhar o processo de mielinização relativamente tarde. A mielinização começa na substância branca da medula espinhal por volta da vigésima segunda semana gestacional, mas ocorre de forma gradativa na substância branca dos hemisférios cerebrais durante os três primeiros anos pós-natal, quando os oligodendrócitos são formados de forma robusta e migram amplamente^{3,20}.

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, e constituem aproximadamente metade das células do cérebro humano. Correspondem a um grupo de células heterogêneas, com diferentes subtipos, que apresentam diferenças quanto a morfologia, desenvolvimento, metabolismo e fisiologia. Ainda não há total elucidação sobre o desenvolvimento dos astrócitos. Todavia, os primeiros astrócitos

são formados a partir da diferenciação direta de células da glia radial, seguida de ciclos de proliferação subsequentes. Os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais, contribuindo com a função neuronal e manutenção da homeostase^{16,20-22}.

As micróglias também integram as células gliais, e constituem os macrófagos residentes do SNC, sendo os principais agentes imunes do tecido nervoso, e também agem na homeostase tecidual. No entanto, as micróglias têm origem fora do SNC, elas têm origem mesodérmica e derivam de progenitores de monócitos/macrófagos, que surgem no saco vitelino por volta da primeira semana gestacional, e penetram no encéfalo rudimentar já no início de sua vascularização. Por volta da quinta semana gestacional os precursores microgliais adentram no SNC e apresentam uma forma ameboide que se diferencia e assume a morfologia ramificada. As micróglias se acumulam gradualmente no SNC, aumentando expressivamente em número nas duas primeiras semanas pós-natais²³⁻²⁵.

1.2 Desenvolvimento cerebelar

Galeno (130-200 d.C.), considerado um dos primeiros anatomistas da história, concluiu que o encéfalo era formado de duas partes: uma anterior, o *cerebrum* e uma posterior, o *cerebellum*^{*26}. Desde então, e passando pelas descrições feitas por Herófilo (335-280 a.C.), médico grego e também um dos primeiros anatomistas da história da medicina, até as observações de Andreas Vesalius (1514-1564), considerado o “pai da anatomia moderna”²⁷, muitos questionamentos foram feitos sobre a estrutura e real função do cerebelo. Hoje, porém, grande parte desses questionamentos já são bem compreendidos.

Como mencionado anteriormente, o cerebelo tem origem do romboencéfalo e metencéfalo. No desenvolvimento cerebelar, alguns componentes da matriz extracelular, como laminina e fibronectina, dão suporte e estimulam à migração de precursores neuronais a partir do neuroepitélio primário, enquanto outras moléculas extracelulares orientam essa migração. Algumas dessas moléculas são fatores solúveis, como as neurotrofinas, ao passo que outras são componentes da matriz,

**Cerebellum*: Palavra que quer dizer “pequeno cérebro”, e denominou-o assim, pela relativa aparência com o cérebro, porém, com um tamanho bem reduzido.

como reelina, netrina e tenascina, que atraem ou repelem neurônios por mecanismos moleculares não totalmente compreendidos²⁸.

Do neuroepitélio primário adjacente ao quarto ventrículo (zona ventricular), as células migram em duas direções. A migração dorsal leva à formação dos núcleos profundos do cerebelo e da camada de células de Purkinje, e ocorre entre a 7ª e 13ª semanas de gestação (Figura 2). A migração dorsolateral forma os lábios rômnicos laterais que darão origem aos neurônios granulares²⁹⁻³¹. A geração de neurônios granulares nos neuroepitélios germinativos, ao contrário das outras regiões cerebelares, ocorre em duas ondas de proliferação e migração (Figura 2)³².

A partir da zona subventricular dos lábios rômnicos, os precursores das células granulares migram e formam a camada de células granulares externa, durante a 10ª e 11ª semanas de gestação. Esta camada superficial do cerebelo é um local de intensa proliferação neuronal, e constitui um neuroepitélio secundário, que dará origem a segunda onda de proliferação de células granulares (Figura 2)^{29,30,33,34}. As células na camada granular externa migram radialmente através da camada molecular (onde são geradas simultaneamente as células estreladas e as células em cesto) em direção à região mais interna, orientadas pelas fibras de Bergmann (glia radial), formando na 21ª semana de gestação a camada granular interna, abaixo da camada de células de Purkinje. Esse processo continua até os 15 a 18 meses de idade pós-natal, quando a camada de células granular externa finalmente desaparece³³⁻³⁵.

Além da formação do córtex cerebelar, o crescimento do verme da linha média aumenta durante o terceiro mês de gestação e é completado por volta da 16ª a 18ª semanas gestacional²⁹⁻³¹.

Após a etapa de proliferação e migração das células, o cerebelo apresenta uma estrutura com profundas fissuras e grandes apêndices semelhantes a dedos denominados de lóbulos ou folhas cerebelares, um processo que continua até os 6 meses de idade pós-natal³⁶. A distribuição celular em cada uma das camadas ocorre da mesma forma em todas as folhas cerebelares, formando uma estrutura tri-laminada^{35,36}. Logo após a formação da estrutura tri-laminada do cerebelo, é observada a maturação de duas das maiores aferências do córtex cerebelar, as fibras trepadeiras e as fibras musgosas.

Como veremos adiante, é relevante para o presente trabalho ressaltar que existem algumas diferenças cronológicas no que se refere ao neurodesenvolvimento

e período gestacional entre humanos e ratos. O desenvolvimento cerebelar dos ratos ao nascimento equivale a 24^a semana gestacional em humanos, dessa forma somente após 10 dias do nascimento o cerebelo do rato neonato pode ser equiparado ao de um bebê nascido a termo (Figura 2). Portanto, no presente trabalho quando provocamos uma inflamação sistêmica nos animais do dia pós-natal (PN) 1 ao 7 equivale a uma lesão prematura em bebês humanos (Figura 2).

O neuroepitélio do cerebelo no rato, surge da porção dorsal do metencéfalo, no nono dia embrionário (E9)³⁷. A proliferação dos precursores neurais na zona ventricular acontece quase exclusivamente na vida intrauterina do roedor, enquanto que os da camada granular externa têm sua proliferação no período neonatal³⁸. Os primeiros neurônios da zona ventricular a serem gerados são os núcleos cerebelares e as células de Purkinje^{39,40}. De acordo com Fonnum e Lock⁴¹, as células de Purkinje em ratos são formadas entre os dias E14 e E16 (Figura 2). Após o nascimento elas formam uma camada com aproximadamente seis células de espessura e pelos dias PN3 e 4 são transformadas numa única camada. A camada de células granulares (CCG) é formada a partir da camada germinal externa (CGE). Os neuroblastos da CGE proliferaram durante a primeira semana pós-natal. Já na segunda semana pós-natal, os neurônios se diferenciam durante a migração através das camadas moleculares e de células de Purkinje, para atingir a maturidade na camada granular interna até o final da terceira semana pós-natal (Figura 2). As células em cesto e as células estreladas são formadas nos dias PN6-7 e PN10-11, respectivamente⁴².

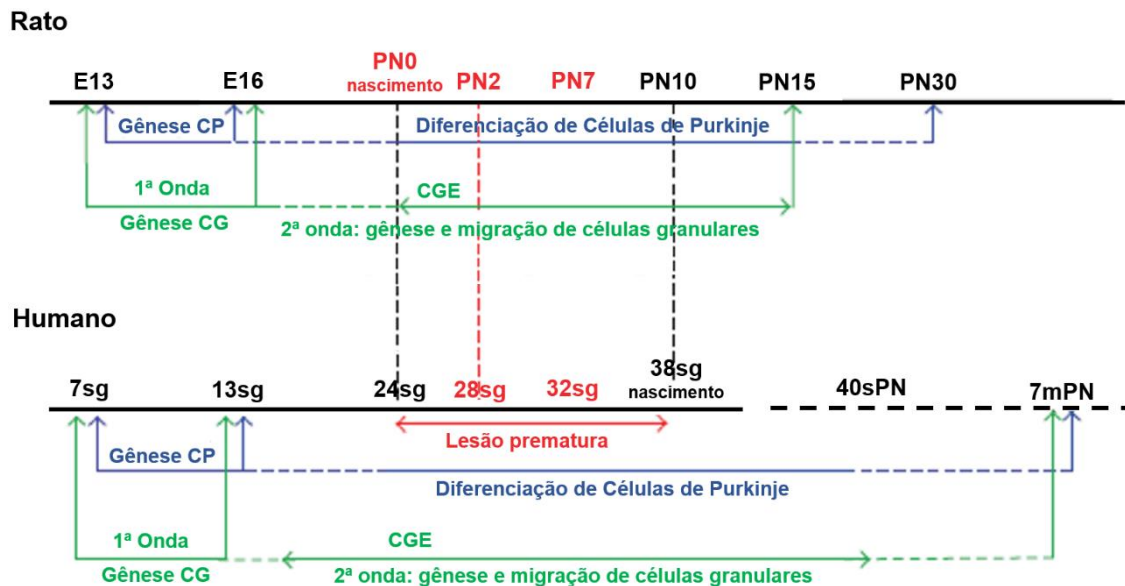


Figura 2 - Comparação temporal do desenvolvimento das células de Purkinje e células granulares no córtex cerebelar em ratos e humanos. Em humanos, entre a 7ª e 13ª semanas de gestação, precursores neurais no metencéfalo migram dorsalmente para a formação dos núcleos profundos do cerebelo e da camada de células de Purkinje. Neste mesmo período, a partir dos lábios rômnicos laterais, migram os precursores das células granulares formando a camada de células granulares externa. Desta camada tem origem a segunda onda de proliferação e migração de células granulares. Em destaque (cor vermelha), o desenvolvimento de ratos neonatos (PN0-10) assemelham a um bebê humano ainda em desenvolvimento entre a 24ª e 38ª semanas de gestação e qualquer manipulação nessa fase pode ser comparada a uma lesão prematura em humanos. Camada granular externa (CGE), células de Purkinje (CP), dia Embrionário (E), dia Pós-Natal (PN), semanas gestacional (sg), semanas pós-natal (sPN), meses pós-natal (mPN) (Fonte: Adaptado de BIRAN et al.)³².

1.2.1 Anatomia cerebelar

O cerebelo possui cerca de 80% dos neurônios presentes no SNC, apesar de seu peso bruto corresponder a apenas 10% do peso total do encéfalo (19% dos neurônios estão situados no cérebro, e 1%, no tronco encefálico)⁴³.

O cerebelo está situado dorsalmente ao bulbo e a ponte, contribuindo para formação do teto do IV ventrículo. Repousa sobre a fossa cerebelar do osso occipital, comunica-se à medula e ao bulbo pelo pedúnculo cerebelar inferior, à ponte e o mesencéfalo pelos pedúnculos cerebelares médios e superiores^{40,44,45}.

Na anatomia do cerebelo podemos destacar o verme, que é uma porção ímpar e mediana que está ligado a duas grandes porções laterais, os hemisférios cerebelares. Sua superfície apresenta sulcos de direção predominantemente transversais que delimitam lâminas finas denominadas folhas do cerebelo. Existem

também sulcos mais pronunciados, as fissuras do cerebelo, delimitando lóbulos, podendo conter várias folhas (Figura 3)^{40,44,45}.

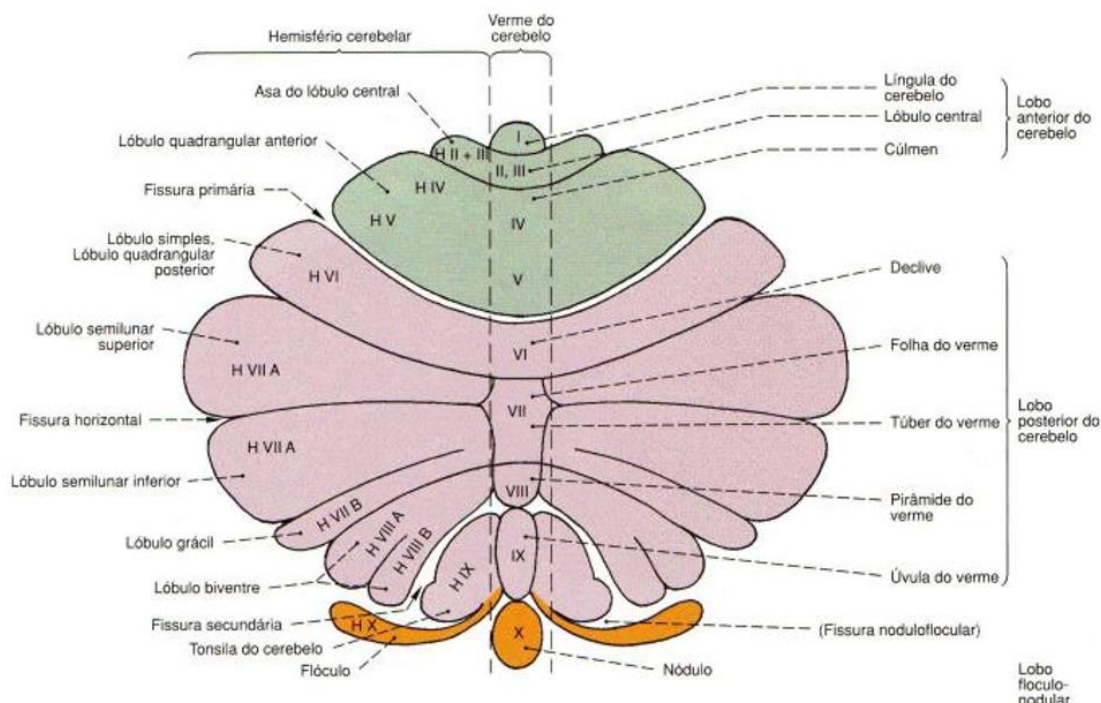


Figura 3 - Representação anatômica do cerebelo. Anatomicamente o cerebelo divide-se em uma região mediana - o verme e duas laterais - os hemisférios cerebelares. Podem ser distinguidos três lobos: flóculo-nodular, anterior e posterior (Fonte: Adaptado de LAZAROV)⁴⁶.

Segundo Larsell⁴⁷, o cerebelo de todo mamífero pode ser dividido em dez lóbulos básicos, numerados com algarismos romanos de I a X, da região anterior para posterior, subdivididos em lóbulos secundários e terciários (Figura 3). A proposta de Larsell baseia-se principalmente na ontogênese do órgão e leva em consideração o fato de que a primeira fissura a aparecer durante o desenvolvimento do cerebelo é a póstero-lateral, dividindo-o em duas partes desiguais, o lóbulo flóculo-nodular e o corpo do cerebelo. Seguido do surgimento da fissura prima que separa o corpo do cerebelo em lobos anterior e posterior^{44,45}.

1.2.2 Histologia cerebelar

O cerebelo está entre os órgãos mais complexos do sistema nervoso central dos mamíferos. O córtex cerebelar possui substância cinzenta (periférica) e

substância branca (central), a exemplo da organização do córtex cerebral. Mais internamente, dentro da substância branca, encontram-se núcleos cerebelares no neocerebelo (núcleo denteado), paleocerebelo (núcleos emboliforme e globoso, denominados conjuntamente de núcleo interpósito) e arquicerebelo (núcleo fastígio), além de axônios amielínicos e células gliais^{43,48}.

O córtex cerebelar é histologicamente homogêneo e sua citoarquitetura é composta por três camadas, como mencionando anteriormente, que se dispõem uniformemente da porção mais exterior à interior, são elas: camada molecular, camada de Purkinje e a camada granular (Figura 4)⁴⁹.

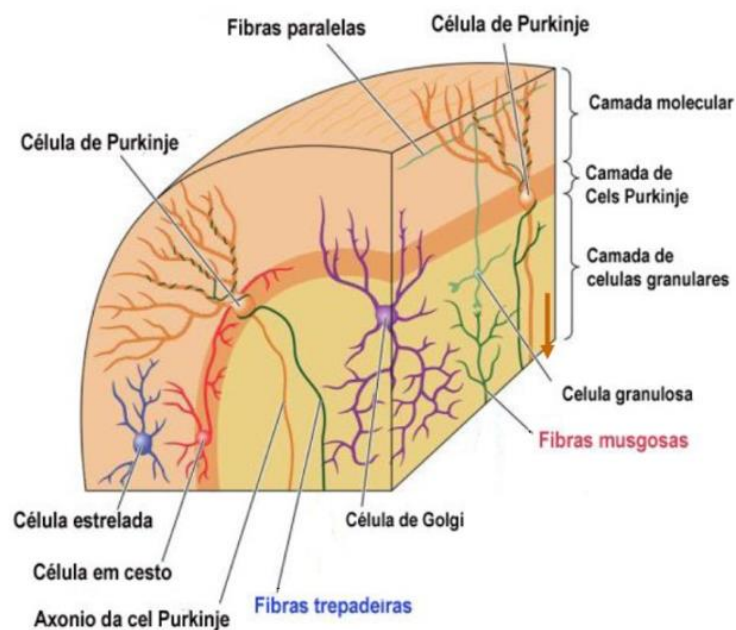


Figura 4 - Citoarquitetura do córtex cerebelar. Camadas do córtex cerebelar e principais tipos de neurônios. Na camada molecular estão presentes as células em cesto e células estreladas. Na camada granular estão as células granulares e células de Golgi. Entre as camadas molecular e granular, encontra-se a camada de células de Purkinje, que como o próprio nome diz, contém as células de Purkinje (Fonte: PURVES et al.)⁸.

A camada molecular possui principalmente fibras orientadas paralelamente com dois tipos de neurônios: as células estreladas e as células em cesto. As células em cesto formam sinapses axossomáticas em forma de cesto ao redor do corpo das células de Purkinje, que recebem sinapses excitatórias das fibras paralelas através dos espinhos dendríticos. As células estreladas projetam axônios para as células de Purkinje adjacentes, recebendo sinais excitatórios das fibras paralelas e transmitindo sinais inibitórios para as células de Purkinje (Figura 4)⁴¹.

A camada de Purkinje contém as células de Purkinje⁵⁰. Essas são células piriformes, grandes e densas, possuem dendritos que se ramificam para a camada molecular e um axônio que sai em direção oposta, terminando nos núcleos centrais do cerebelo e exercendo uma função inibitória. Além disso, os axônios das células de Purkinje enviam projeções colaterais para outras células de Purkinje, células em cesto, células estreladas, e células de Golgi⁴¹.

As células de Purkinje recebem aferências extra-corticais diretas pelas fibras trepadeiras oriundas do núcleo olivar inferior e, indiretas, por meio das fibras musgosas através das fibras paralelas das células granulares. Em contrapartida, as células de Purkinje representam as únicas eferências do córtex cerebelar (Figura 5). Desse modo, a morte de células de Purkinje pode resultar em lesão funcional do cerebelo³⁶.

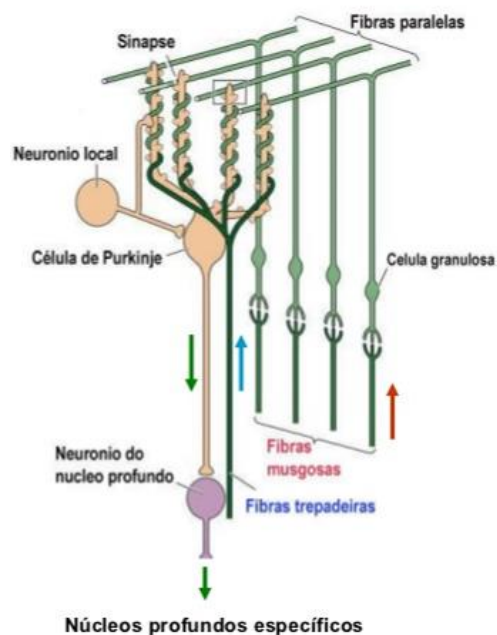


Figura 5 - Circuito de aferência e eferência do córtex cerebelar. As fibras musgosas chegam às células granulares, cujos axônios constituem as fibras paralelas. As fibras paralelas formam sinapses com as células de Purkinje. As fibras trepadeiras interligam-se diretamente às células de Purkinje. As células de Purkinje representam as únicas eferências do córtex cerebelar (Fonte: PURVES et al.)⁸.

A camada granular é composta principalmente de células granulares ou grânulos do cerebelo, sendo células muito pequenas onde o citoplasma é reduzido. Os axônios das células granulares se dirigem à camada molecular e se bifurcam em forma de T dando origem às fibras paralelas que fazem contato sináptico excitatório com as células de Purkinje, as células em cesto, as células estreladas, e as células

de Golgi (Figuras 4 e 5). As células granulares são ativadas pelas fibras musgosas provenientes de outras regiões do cérebro, exceto da oliva inferior que ativa as células de Purkinje através das fibras trepadeiras (Figuras 4 e 5)^{8,40}.

Além disso, a camada granular possui outro tipo de neurônio, as células de Golgi, as quais possuem ramificações bem amplas. São células menos numerosas do que as células granulares, mas possuem ampla propagação dendrítica que atinge a camada molecular e são excitadas pelas fibras musgosas.

Podemos destacar dois importantes neurotransmissores associados ao cerebelo: o ácido-gama-amino-butírico (GABA) e o glutamato. O GABA tem função inibitória e está presente em todas as células do cerebelo, com exceção das células granulares, que tem o glutamato como neurotransmissor e possuem função excitatória no córtex cerebelar^{34,41}.

O cerebelo, através das vias aferentes e eferentes faz conexões com diversas estruturas do SNC, tais como córtex pré-frontal, córtex parietal posterior, temporal superior, região occipito-temporal, assim como regiões límbicas.

Devido a essa ampla gama de conexões ele está associado a funções motoras como coordenação motora e equilíbrio, funções executivas, integração de informação sensitiva e sensorial, organização visuo-espacial, memória visual, controle do comportamento e da motivação e também, com funções cognitivas e vegetativas⁵¹⁻⁵³.

Há pouco tempo, o cerebelo passou a ser relacionado também a patologias psiquiátricas, como a esquizofrenia⁵⁴, distúrbios do humor e ansiedade⁵⁵, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH)⁵⁶ e distúrbios do espectro do autismo⁵⁷.

Um estudo realizado por Jaeger mostrou que em neonatos, a estimulação, supressão ou lesão de algumas regiões do cerebelo pode modificar ajustes rápidos e automáticos que mantêm o equilíbrio e a programação e refinamento dos movimentos voluntários e involuntários⁵⁸. Contudo, apesar do conhecimento sobre a anatomia cerebelar, ainda não há consenso a respeito de como o processamento de informações nos circuitos cerebelares possibilita que o cerebelo exerça as funções as quais está associado.

Todo conhecimento sobre o cerebelo, descoberto ao longo da história, consolida-se hoje como a base para as mais amplas pesquisas, realizadas em

laboratórios de todo o mundo, na busca de se compreender cada vez mais sua estrutura, funções e mecanismos pelos quais atua.

1.3 Neuroinflamação

A inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado por diferentes tipos celulares, sinais químicos e vias de sinalização celular. Ela é uma resposta estimulada por traumas, lesões e invasão tecidual por agentes infecciosos, com o objetivo de potencializar a recuperação e regeneração do tecido e eliminar micro-organismos ou outros agentes irritantes⁵⁹. No entanto, quando a resposta inflamatória é persistente e exacerbada, pode agravar o dano tecidual⁶⁰.

Podemos destacar os principais fatores envolvendo o processo inflamatório: alterações na permeabilidade vascular; ativação e infiltração de células do sistema imune; e produção de citocinas. A resposta inflamatória pode apresentar dois estágios, um agudo e um crônico. A inflamação aguda é o estágio inicial do processo inflamatório, o qual é mediado pela ativação do sistema imune inato (composto por células fagocíticas, dendríticas e células Natural Killer) que corresponde a primeira linha de defesa do organismo, com resposta rápida, e persiste apenas por um período curto. Se o processo inflamatório persistir por um longo período, esse segundo estágio é denominado como inflamação crônica e envolve a ativação do sistema imune adaptativo (composto por linfócitos B e T) caracterizado como uma linha de defesa do organismo que age mais lentamente, e envolve componentes com maior especificidade^{6,61}.

No SNC o processo inflamatório é denominado neuroinflamação, apresentando características específicas devido a sua localização anatômica^{60,62}. Por exemplo, a resposta inflamatória no encéfalo não apresenta sintomas clássicos como rubor, tumor, calor e dor, que são comumente vistos na inflamação em outros sistemas. Além disso, o recrutamento de leucócitos, que é rápido nos órgãos periféricos, apresenta-se modesto e tardio no tecido nervoso⁶³.

Parte dessas diferenças pode ser explicada pela presença da barreira hematoencefálica (BHE). A BHE exerce um papel primordial na proteção do SNC através de sua complexa seletividade. O aumento da permeabilidade da BHE pela inflamação, favorece a migração de leucócitos para dentro do parênquima cerebral.

O comprometimento da unidade vascular está implicado na patologia de inúmeras doenças neurodegenerativas⁶⁴.

Além da permeabilidade da BHE, sabe-se que a regulação da resposta inflamatória é também modulada pela resposta das células residentes do cérebro, as micróglias e os astrócitos (e em menor extensão os neurônios) (Figura 6)⁶⁵.

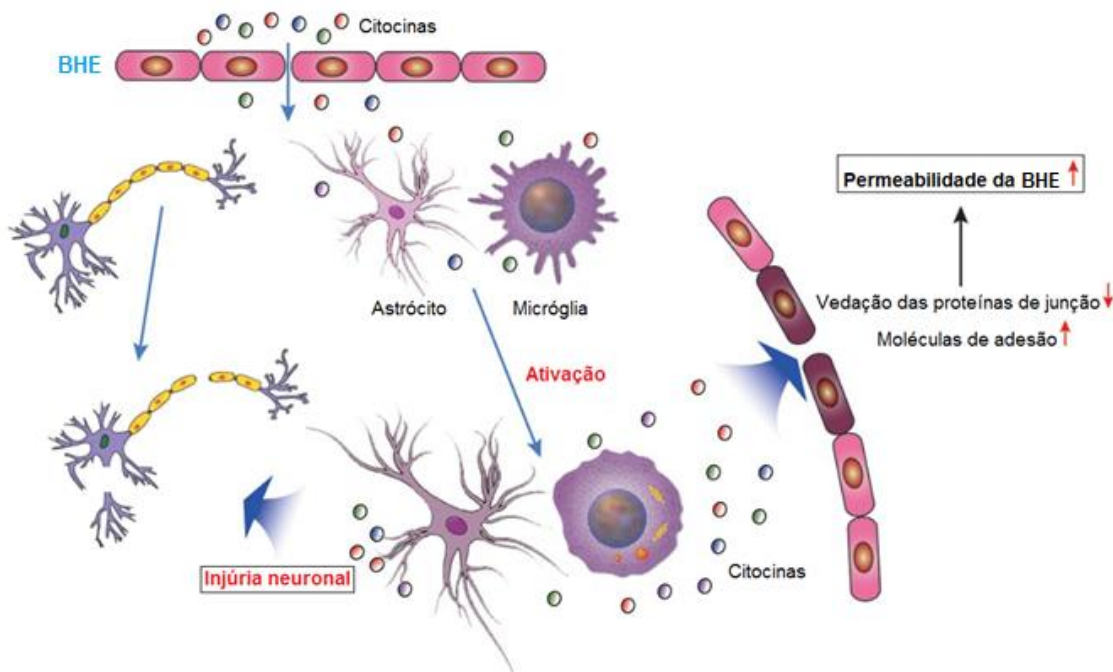


Figura 6 - Mecanismo de Neuroinflamação. A neuroinflamação é caracterizada pela ativação de micróglias e astrócitos, que liberam mediadores inflamatórios que podem alterar a BHE e causar dano neural. Nota – BHE: barreira hematoencefálica (Adaptado de CHEN et al. e SILVA)^{6,66}.

As micróglias são as principais células imunes residentes do SNC. Em condições normais apresentam uma morfologia ramificada^{67,68} responsáveis por manter a homeostase tecidual⁶⁵. Os astrócitos regulam ativamente as funções do SNC, e exibem grandes prolongamentos, apresentando morfologia semelhante à de uma estrela (Figura 6)^{6,69-71}.

As micróglias e/ou os astrócitos respondem a estímulos inflamatórios desencadeados por ligação de moléculas tais como adenosina trifosfato (ATP), LPS, proteínas endógenas e citocinas em receptores presentes na superfície da membrana celular⁷²⁻⁷⁴. As micróglias quando ativadas retraem os prolongamentos, adquirindo um fenótipo ameboide e consequente capacidade de migração, fagocitose e mitose (Figura 6)^{6,75}. Os astrócitos ativados também se dividem e se

tornam hipertróficos, apresentando prolongamentos curtos e espessados (Figura 6)^{6,70}.

A ativação de micróglia e de astrócitos também resulta, por exemplo, no aumento da síntese e secreção de diversas citocinas, tais como interleucinas (IL-1 β , IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (*em inglês* TNF), entre outras. Em concentrações basais, as citocinas têm um papel fundamental no desenvolvimento e no funcionamento do SNC. Mas, quando produzidas em níveis elevados e contínuos podem potencializar o processo neuroinflamatório. O TNF se apresenta nas formas α e β e suas proteínas são derivadas de dois genes diferentes⁷⁶. Essa citocina é sintetizada pela estimulação de monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, neutrófilos e mastócitos, após injúria traumática e promove neuroinflamação e neurodegeneração^{77,78}. Além disso, a ativação de células da glia aumentam também a síntese/atividade de enzimas tais como ciclo-oxigenase 2 (COX2), NOS induzível (*em inglês* Nitric Oxide Synthase), e NOX (*em inglês* Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase), levando respectivamente a maior concentração de prostaglandina 2 (PGE2), óxido nítrico (*em inglês* NO) e ânion superóxido (O₂⁻). Assim, a inflamação também gera estresse oxidativo, como veremos adiante^{73,79}.

1.4 Estresse oxidativo e suas consequências no SNC

As células são formadas por diferentes moléculas, constituídas por um ou mais átomos ligados quimicamente uns aos outros. Esses átomos são rodeados por elétrons pareados. Ocasionalmente os átomos perdem ou ganham um elétron, e ficam com elétrons não pareados. Chamamos esses átomos/moléculas com elétrons não pareados de radicais livres e são os mediadores do estresse oxidativo⁸⁰. Os radicais livres por sua vez são altamente instáveis e reativos⁸¹.

Existem dois principais tipos de radicais livres: as espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species* - RNS)⁸⁰. ROS incluem, por exemplo, os radicais O₂⁻ e hidroxila (OH^{*}) e também o não radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂); enquanto RNS incluem, por exemplo, os radicais óxido nítrico (NO^{*}) e peroxinitrito (ONOO⁻), espécies que são sintetizadas nas células por diferentes vias⁸².

As ROS são constantemente produzidas durante as reações do metabolismo humano, em geral produzidas no metabolismo aeróbico, como produto intermediário

do metabolismo do oxigênio⁸³. Essas espécies reativas desempenham funções fisiológicas relevantes como fagocitose, sinalização celular, regulação de proteínas e plasticidade sináptica. Porém, quando em excesso, as espécies reativas induzem o estresse oxidativo⁸¹.

Como proteção contra níveis aumentados de ROS e RNS, as células possuem vários agentes antioxidantes e antirredutores para a manutenção da homeostase redox, como enzimas (p. ex. superóxido dismutase [SOD]), e compostos não enzimáticos (p. ex. glutathiona reduzida [GSH] e ácido ascórbico, entre outros)^{6,82,84,85}. Em condições normais, o ambiente de oxidação e redução intracelular (ambiente redox) é regularmente controlado e mantido em estado redutor, exceto se a célula for exposta a situações oxidantes extremas. A homeostase redox é crucial para manter a atividade biológica e a geração adequada tanto de ROS quanto RNS⁸⁶.

O estresse oxidativo pode ser interpretado como a resposta de defesa do organismo a um agente agressor, na qual a formação de espécies reativas, supera significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, levando conseqüentemente à lesão de biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Contudo, atualmente há uma descrição mais complexa e elaborada para estresse oxidativo, na qual ele é definido como resultado da síntese excessiva e patológica de ROS e RNS que, além de causar danos a biomoléculas, ativa vias de sinalização redox patológicas, levando a proliferação celular, migração celular, remodelamento da matriz celular e inflamação^{6,87}.

O estresse oxidativo, assim como a inflamação, pode possuir um papel benéfico ou deletério, dependendo da sua intensidade, e parece estar envolvido na patogênese do dano neurológico de várias doenças que afetam o SNC⁸¹.

O tecido nervoso é especialmente susceptível ao dano oxidativo por possuir altas taxas metabólicas, por sua reduzida capacidade de regeneração celular e por sua reduzida capacidade antioxidante, em comparação com outros tecidos^{88,89}. Na prática, a presença de agentes antioxidantes no tecido cerebral é modesta. Os níveis de catalase (enzima que catalisa a formação de H₂O e O₂ a partir do H₂O₂), por exemplo, são baixos no hipotálamo e na substância negra, e ainda menores no cerebelo e no córtex^{81,90}.

Ao nascimento, ocorre estresse oxidativo em todos os recém-nascidos como consequência do desafio hiperóxico devido à transição do ambiente hipóxico

intrauterino para a vida extrauterina⁹¹. Há um aumento na concentração de O_2 no SNC do recém-nascido logo após o nascimento em relação ao feto, o que acarreta aumento de $O_2^{\cdot-}$ e, conseqüentemente, leva ao estresse oxidativo. Além disso, a expressão de NOS neuronal e NOS induzível aumenta após o nascimento e atinge um pico no quinto dia pós-natal. O início do período pós-natal é marcado pela eliminação apoptótica de neurônios e de células gliais excedentes. As células apoptóticas são fagocitadas por micróglia com conseqüente produção de ROS e NOS^{6,92}.

Como já mencionado, a inflamação, decorrente ou não de infecção, é outra condição capaz de gerar estresse oxidativo⁹³. A neuroinflamação pode aumentar as concentrações de ROS e RNS, conseqüência, por exemplo, do aumento induzido da síntese/atividade de enzimas tais como NOS induzível e NOX^{88,94}.

Estresse oxidativo e neuroinflamação são os dois principais fatores subjacentes à neurodegeneração. Além disso, diversos estudos apontam que o cerebelo sofre alterações degenerativas na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e Doença de Huntington, indicando assim, correlação do estresse oxidativo com danos potenciais à estrutura cerebelar.

Os recém-nascidos, particularmente os prematuros, por não terem o sistema imune completamente formado e pelo tempo prolongado de internação em unidades de terapia intensiva neonatais, são mais vulneráveis/suscetíveis à infecção e/ou à inflamação e, conseqüentemente, também ao estresse oxidativo⁹¹.

1.5 Prematuridade e sua repercussão sobre o cerebelo

Processos infecciosos e/ou inflamatórios maternos durante a gestação (sistêmicos ou placentários) possibilitam que citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , por exemplo) alcancem a circulação sanguínea fetal, cruzem a BHE e desencadeiem neuroinflamação no SNC em desenvolvimento, podendo trazer conseqüências diversas. O sistema imune fetal também pode ser uma fonte de produção e secreção de citocinas após a infecção e/ou inflamação materna, no entanto, a resposta imune fetal depende do estágio de desenvolvimento do feto. Além disso, a resposta imune materna e/ou fetal pode induzir o nascimento prematuro^{6,95,96}.

A prematuridade é definida, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como o nascimento de crianças antes da maturidade fetal. Estima-se que 15 milhões de bebês nascem pré-termo a cada ano no mundo. Segundo um estudo do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a prevalência de partos de crianças prematuras no Brasil chega a 11,7% em relação a todos os partos realizados no país⁹⁷.

Apesar de quase metade dos casos de partos prematuros serem considerados de causa desconhecida, em uma porcentagem deles, pode-se identificar fatores de risco maternos e fetais, que podem ser classificados em epidemiológicos, obstétricos, ginecológicos, clínico-cirúrgicos, genéticos e iatrogênicos⁹⁸. Como já mencionado, entre esses fatores, ressalta-se a associação com processos inflamatórios perinatais⁹⁹.

De acordo com a OMS, existem subcategorias de nascimento prematuro, baseadas na idade gestacional: extremamente prematuro (menos de 28 semanas); muito prematuro (28 a 32 semanas) e pré-termo moderado a tardio (32 a 37 semanas). Quanto menor a idade gestacional, maiores são os riscos de o recém-nascido estar sujeito a complicações agudas e em longo-prazo⁹⁸.

No que diz respeito ao SNC, o nascimento prematuro pode resultar em distúrbios neurológicos e/ou psiquiátricos em longo-prazo^{100,101}. Ainda que a literatura associe o comprometimento do desenvolvimento do SNC em recém-nascidos à prematuridade por si só, outros estudos também tem revelado que alterações do SNC podem ser, pelo menos em parte, consequências da exposição dos neonatos prematuros a fatores estressantes durante o período de internação hospitalar, tais como alteração da estimulação auditiva e luminosa, redução dos cuidados maternos, dor e desenvolvimento de infecções e/ou processos inflamatórios^{6,102,103}.

Infecção e/ou inflamação no período perinatal podem levar ao rompimento da BHE¹⁰⁴, disfunção e/ou morte de neurônios e oligodendrócitos^{91,105} e desenvolvimento de leucomalácia periventricular¹⁰⁶. Estudos clínicos indicam que infecção e/ou inflamação durante o desenvolvimento do SNC podem atuar como insulto desencadeador de paralisia cerebral, e também de autismo e esquizofrenia^{6,107-109}.

Em modelos animais foi demonstrado que a exposição à infecção e/ou inflamação no período neonatal, está associada com aumento da permeabilidade da

BHE¹¹⁰, lesão das substâncias branca e cinzenta¹¹¹, dilatação ventricular¹¹² e redução de neurônios em regiões do hipocampo e do cerebelo^{113,114}. Também são relatadas alterações tardias da aprendizagem e memória, da resposta à dor e dos comportamentos de ansiedade nesses animais^{115,116}.

A hemorragia cerebelar é a lesão destrutiva melhor estudada na prematuridade. As hemorragias são seguidas de atrofia cerebelar e ligadas a patologias que comprometem o fluxo sanguíneo cerebral¹¹⁷, estando associada com alta prevalência de comprometimento cognitivo, de aprendizado, e do comportamento a longo prazo²⁹.

Além da hemorragia cerebelar, a neuroinflamação em períodos críticos do desenvolvimento está relacionada ao baixo desenvolvimento cerebelar e a perda neuronal¹¹⁷, especificamente pode provocar diminuição da densidade e volume de células de Purkinje acompanhada por comprometimento na coordenação motora e equilíbrio, além de causar um padrão difuso de danos na substância branca cerebelar^{32,118}. Os danos na citoarquitetura cerebelar são permanentes, constituindo prováveis mecanismos para o surgimento de doenças neurodegenerativas^{119,120}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

✓ Avaliar os efeitos crônicos, no cerebelo, de um processo inflamatório sistêmico durante o período neonatal.

2.2. Objetivos específicos

✓ Investigar as consequências da inflamação sistêmica neonatal sobre a atividade imune no cerebelo a longo prazo;

- Avaliar o número de células da micróglia no cerebelo, por meio de imunofluorescência para *Ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1, marcador de micróglia).

✓ Avaliar se a inflamação sistêmica neonatal altera a densidade de neurônios do cerebelo na vida adulta;

- Avaliar o número de células de Purkinje por meio de imunofluorescência para *calbindina*.

✓ Mensurar alterações no nível de estresse oxidativo na estrutura cerebelar de ratos adultos após inflamação sistêmica neonatal, por meio de histoquímica para dihidroetídio (DHE);

✓ Analisar os efeitos da inflamação sistêmica durante o período neonatal sobre a atividade locomotora a longo prazo;

- Avaliar a atividade locomotora e o comportamento associado à ansiedade em ratos adultos por meio do teste de campo aberto (*Open-Field*).

✓ Identificar a expressão gênica de citocina (TNF- α) relacionada a neuroinflamação crônica por meio de qPCR.

3. METODOLOGIA

Os procedimentos e experimentos realizados nesse estudo são apresentados de forma esquemática na figura a seguir (Figura 7).

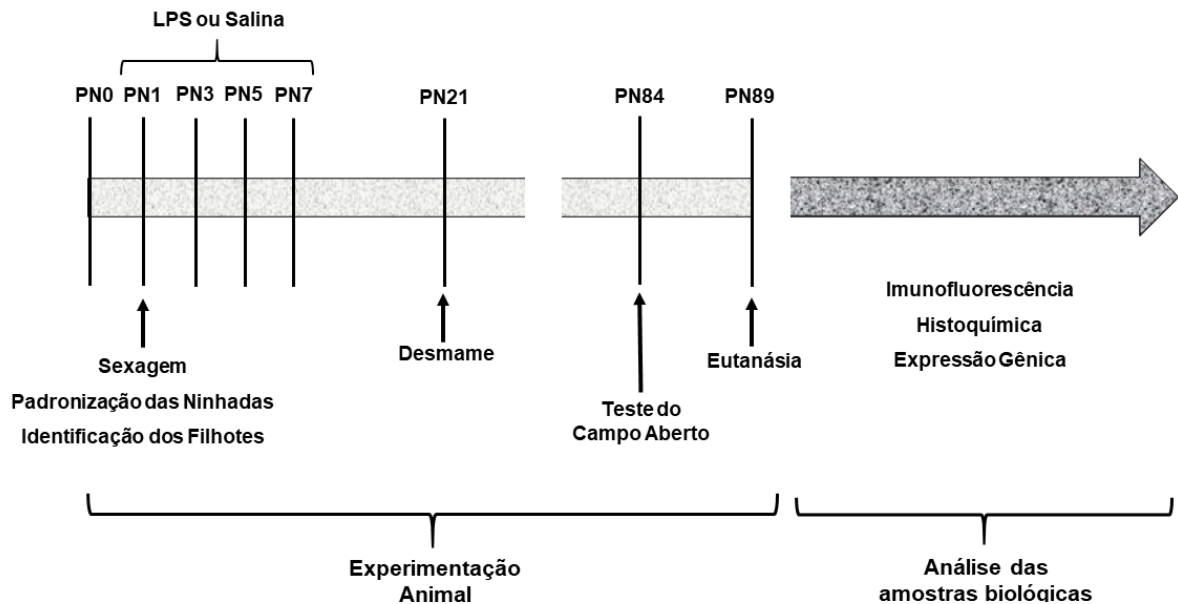


Figura 7 - Delineamento experimental. Nota – PN: dia pós-natal; LPS: lipopolissacarídeo. (Fonte: Elaborado pelo próprio autor).

3.1. Animais experimentais

O projeto foi desenvolvido sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - número 9781020317 (Anexo). Neste trabalho, foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar* (heterogênico), procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) – UNIFESP. Os animais foram alojados em gaiolas com forragem de maravalha, com água e ração (Nuvilab) à vontade. Também foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de 12h claro/escuro (lâmpadas acesas das 6h às 18h).

Inicialmente, um total de 10 ratas prenhes foi utilizado para a obtenção dos filhotes. As ratas prenhes foram mantidas individualmente em gaiolas (acrílico, transparentes e medindo aproximadamente 42x26x18 cm) em estantes ventiladas (TECNIPLAST) no biotério setorial do CEDEME.

Os filhotes permaneceram junto as mães desde o nascimento, considerado o dia pós-natal zero, até o dia PN21, quando ocorreu o desmame. No PN1, era feita a sexagem dos filhotes com base na distância anogenital (Figura 8), e cada ninhada foi padronizada com oito filhotes machos por mãe, em alguns casos por meio de adoção cruzada, com o objetivo de manter a uniformidade de peso e evitar lotação das gaiolas. Filhotes fêmeas, assim como os filhotes machos excedentes em cada ninhada foram eutanasiados. Após o desmame, os filhotes foram separados em gaiolas de polipropileno contendo até três animais, e as mães foram eutanasiadas.

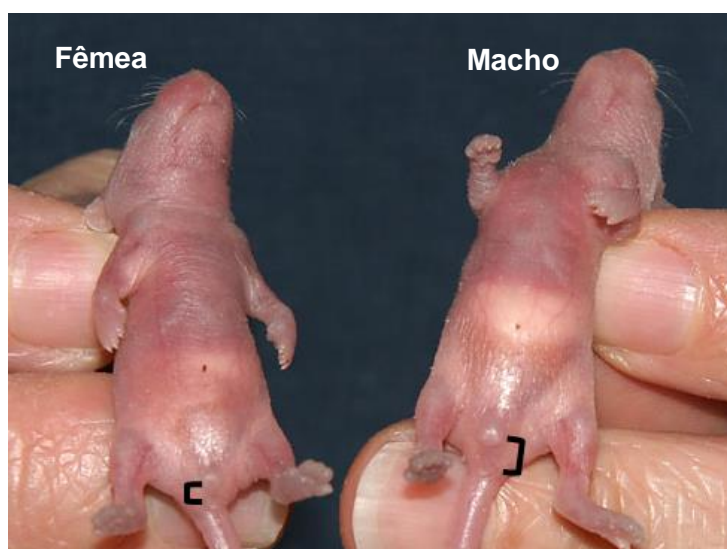


Figura 8 - Diferença anatômica em relação à distância anogenital entre filhotes fêmea e macho. A fêmea, apresenta distância anogenital menor (barra) quando comparada ao macho (Fonte: Adaptado do website American Fancy Rat and Mouse Association).

Também no PN1, os filhotes foram tatuados nas patas, de forma que individualizasse cada animal dentro da ninhada. Cada tatuagem foi feita injetando 2 μ L de solução de pasta verde (Ketchum Manufacturing Inc, Canadá), usando seringa de insulina de 0,5mL (agulha com 8mm de comprimento e 30G de calibre). Nas patas sem tatuagem, foram injetados 2 μ L de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril, fazendo com que todos os filhotes recebessem o mesmo volume de solução (pasta verde ou salina) em cada uma das patas.

A solução de pasta verde foi preparada com água destilada (50mg/mL) e usada durante todo período de experimentos. O volume da solução de pasta verde usado para tatuar era aspirado com uma pipeta automática, alocado sobre um pedaço de parafilme na bancada, aspirado cuidadosamente com a seringa e injetado

na região plantar da pata do animal. A agulha da seringa era inserida no subcutâneo da pata e avançada 1-1,5mm, paralelamente à superfície da pele e em direção a um dos dedos. Se necessário, a pata era limpa para remover algum refluxo de solução de pasta verde.

Durante os procedimentos de sexagem, de marcação para diferenciação dos grupos experimentais e para administração das soluções (ver adiante), as mães eram alojadas temporariamente em uma nova gaiola e os filhotes eram mantidos em suas gaiolas “moradias”, e levados do biotério para uma sala de manipulação no intuito de que as mães não ouvissem a vocalização dos filhotes, minimizando o estresse dessas ratas. Durante os procedimentos os filhotes eram mantidos sobre uma faixa térmica aquecida (Conforto e Terapia produtos térmicos). A manipulação dos animais foi feita sempre entre 7h e 10h da manhã. No PN78, os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Neurobiologia – UNIFESP, onde permaneceram até a data da eutanásia.

3.1.1. Grupos experimentais e administração das soluções

No PN1, os filhotes foram alocados aleatoriamente nos grupos experimentais e, quando possível, cada ninhada teve pelo menos um representante de cada grupo de estudo. Os grupos experimentais e a administração das soluções foram definidos da seguinte forma:

- **Grupo LPS (n= 11)** – a indução do processo inflamatório sistêmico neonatal foi realizada por meio de injeção intraperitoneal de LPS. Os animais deste grupo experimental receberam injeção de 1mg/Kg¹²¹ de LPS (Sigma L-2630 [Escherichia coli, sorotipo 0111:B4]), dissolvido em solução de cloreto de sódio 0,9% estéril (0,2mg de LPS/mL de salina), resultando em 5mL/Kg de volume injetável.

Com o intuito de posteriormente ampliar este estudo, animais do grupo LPS também receberam uma injeção de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril (5mL/Kg) 30min antes da injeção de LPS.

- **Grupo SHAM (n= 8)** – Os animais deste grupo experimental receberam duas injeções de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril (5mL/Kg, i.p.), com intervalo de 30min entre elas.

- **Grupo NAIVE (n= 9)** – Os animais deste grupo experimental não receberam injeções intraperitoneais de qualquer tipo.

A administração das soluções (usando seringa de insulina de 0,5mL, agulha com 8mm de comprimento e 30G de calibre), foi realizada nos dias PN1, PN3, PN5 e PN7 (Figura 7).

3.1.2. Monitoramento dos animais

Entre o PN1 e PN15, período considerado mais crítico devido aos estímulos inflamatórios e também à manipulação maior dos filhotes, os animais foram checados diariamente para acompanhar a vitalidade dos mesmos e verificar a ocorrência de óbitos. Após esse período, os animais foram monitorados em dias alternados.

Os animais foram pesados no PN1, PN3, PN5 e PN7, particularmente para calcular o volume das soluções administradas e monitorar os animais durante o período agudo do tratamento. A pesagem foi realizada apenas nos dias de tratamento para minimizar o efeito da separação materna. Adicionalmente, eles foram pesados no PN21, PN45 e PN89 para avaliar o desenvolvimento.

3.2. Avaliação comportamental - teste de Campo Aberto

Num primeiro momento pensamos em utilizar o Rotarod, teste que representa uma das principais abordagens na avaliação de coordenação motora e equilíbrio, caracterização fenotípica motora em modelos animais¹²². Porém, como a avaliação motora dos animais foi realizada apenas em PN84, quando já estavam muito grandes, não foi possível realizar o teste de forma satisfatória. Como alternativa, a atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio do teste de Campo Aberto.

O teste de Campo Aberto tem por finalidade analisar e quantificar a atividade locomotora espontânea geral. Esse teste é baseado no modelo descrito por Lima e colaboradores¹²³ e foi realizado em uma arena circular de madeira com fundo de cor preta (Figura 9), com as seguintes medidas: diâmetro de 97,5cm e altura de 34cm. O fundo do aparato foi dividido em zonas periférica e central, e estas subdivididas digitalmente em partes (quadrantes) aproximadamente iguais. A arena foi alojada

em uma sala dedicada para esse fim, adequadamente iluminada (luminária no teto coberta com papel manteiga branco e duas lâmpadas fluorescentes no piso, luz branca, fria, 16W cada) e isolada do laboratório, de forma que não houvesse interferência de fatores do ambiente externo. Suspensa, acima da região central da arena, havia uma câmera de vídeo (Panasonic; modelo WV-CP504), ligada a um computador localizado fora da sala de filmagem. As gravações foram analisadas por meio do programa EthoVision (Noldus; versão 7.0).



Figura 9 - Aparato utilizado no teste do Campo Aberto. (Fonte: Elaborado pelo próprio autor).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: a distância total percorrida (cm), velocidade média (cm/s), permanência na zona interna (s), frequência na zona interna, permanência na zona periférica (s), frequência na zona periférica, permanência em estado de imobilidade (s) e permanência em estado de mobilidade (s).

A distância total percorrida define-se como o deslocamento do animal por todos os quadrantes das zonas periférica e central, sendo um dos fatores avaliados neste parâmetro o grau de comprometimento do sistema locomotor. A locomoção

periférica refere-se quando o animal passa com as quatro patas de um quadrante para o outro, na região periférica da arena. Já a locomoção central, tem os mesmos parâmetros da locomoção periférica, mas acontece na região central da arena. No campo aberto esses movimentos estão relacionados a respostas emocionais dos animais, tendo em vista que em condições normais roedores tendem a permanecer mais próximos às paredes da arena, possivelmente por se sentirem mais seguros nessa região da arena, demonstrando neste caso pouco impulso exploratório e maiores níveis de ansiedade e medo. A área central do aparato é considerada uma área mais aversiva que a região periférica. Quanto maior a locomoção e o tempo que o animal passa no centro do aparato, menor é o índice de ansiedade/emocionalidade.

Os animais foram levados para o laboratório 30 min antes do início do teste, para ambientação com o local. Cada animal foi posicionado no centro do aparelho, e observado durante 10min. Entre um animal e outro, o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% para que não houvesse interferência do odor do animal anterior. O teste foi realizado no PN84⁶, sempre durante o período da tarde (15-17h).

3.3. Avaliação Histológica

3.3.1. Fixação do tecido – Perfusão

Os animais foram eutanasiados no PN89⁶.

Para permitir posterior realização de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas no tecido encefálico, uma parte dos animais foi perfundida com solução fixadora. Para realização deste procedimento, eles foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução contendo 15mg/kg de xilazina, 80mg/kg de quetamina e 1mg/Kg de acepromazina. Uma vez constatada a profunda sedação do animal (pela ausência de resposta a estímulo nociceptivo) a cavidade torácica foi aberta e o coração exposto. Em seguida, uma agulha com calibre de 18G, acoplada em uma das extremidades da mangueira da bomba peristáltica (Cole-Parmer/Masterflex; console modelo 7554-80), foi inserida no ventrículo esquerdo até atingir a aorta ascendente. O átrio direito foi cortado, fazendo a lavagem com tampão fosfato (PB) 0,1M (fosfato de sódio monobásico anidro 0,023M, fosfato de sódio dibásico anidro 0,077M [pH 7,2-7,4]) para remover o sangue. Em seguida, foi

passada uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em PB 0,1M. Ao final da perfusão, os encéfalos foram extraídos, mantidos por 24h na solução fixadora e depois crioprotégidos, por 72h, em solução de sacarose 30% em PB 0,1M, a 4°C. Após a desidratação, os encéfalos foram congelados com gelo seco e guardados no *ultrafreezer* (-80°C) até serem cortados em criostato.

3.3.2. Corte dos encéfalos

Os encéfalos foram cortados em fatias coronais com espessura de 40 µm utilizando um criostato (LEICA, CM 1850). Os cortes do cerebelo, e separadamente do cérebro, foram distribuídos em sequência em placas acrílicas com 24 poços contendo uma solução *antifreezing* (sacarose 30% [massa/volume] e etilenoglicol 30% [volume/volume] em PB 0,1M) e armazenados a -20°C para processamento posterior.

3.3.3. Imunofluorescência para micróglia e células de Purkinje

Os cortes de cerebelo foram lavados, sob agitação leve, 5x de 5min com PB 0,1M/pH7,4 para remoção da solução *antifreezing*. Em seguida, eles foram incubados por 20min em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em PB e lavados 3x de 5min com PB 0,1M/pH7,4 sob agitação leve. Foi realizado bloqueio de marcação inespecífica e aumento da permeabilidade da membrana com uma solução de soro fetal bovino 3% e detergente Triton X-100 0,27% em PB sob agitação leve, por 30min e, em seguida, os tecidos foram incubados ao mesmo tempo com anticorpos primários anti-calbindina-D-28K (Sigma C9848 clone CB-955, produzido em camundongo, diluição 1:3500) e anti-Iba1 (Abcam ab5076, produzido em cabra, diluição 1:500), diluídos em solução de bloqueio e detergente, “*overnight*”, à temperatura ambiente. No dia seguinte, eles foram lavados, 5x de 5min com PB e incubados com os anticorpos secundários anti camundongo e anti-cabra conjugados com Alexa Fluor® 546 (Life Technologies A-11061) e Alexa Fluor® 488 (Life Technologies A21206), respectivamente, diluídos (1:500) em solução de bloqueio e detergente por 2h sob agitação leve. Após a incubação, os cortes foram novamente lavados, 5x de 5min com PB e, em seguida, incubados com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol; 0,57µM; Sigma D9564 - 1:10.000) em PB por 10min,

protegidos da luz. Por fim, foram lavados sob agitação leve, 5x de 5min com PB, montados em lâminas silanizadas e, após secarem, fechados com Fluoromount-G (SouthernBiotech 0100-01) e lamínula.

3.3.4. Análise Estereológica

A estereologia é um método que possibilita a análise quantitativa de um órgão, tecido ou estrutura por meio da determinação de parâmetros objetivos em imagens tridimensionais. Para isso utiliza-se de princípios geométricos, matemáticos e estatísticos¹²⁴.

A contagem do número de células de Purkinje e micróglia foi realizada por meio de estereologia tridimensional com o método do fracionador óptico, que combina a amostragem do fracionador e o dissector óptico de contagem¹²⁵, utilizando o software Stereo Investigator (MBF Bioscience, EUA). Este método permite obter estimativas próximas dos valores reais sem viés, mediante coleta sistemática e aleatória de dados.

Aplicando o princípio de Cavalieri, os cortes foram selecionados de forma sistemática, uniforme e aleatória. Para isso, o primeiro corte histológico foi selecionado entre o 1º e o 24º poço da placa, e os seguintes a cada 240µm (um a cada 6 poços), totalizando seis secções por animal, entre os níveis de Bregma - 9,12mm e -12,00mm.

Inicialmente, os parâmetros utilizados para a contagem das células de Purkinje e micróglia no cerebelo foram definidos por contagens preliminares baseadas nos trabalhos de Larsen e colaboradores¹²⁶ e Perez-Pouchoulen e colaboradores¹²⁷, respectivamente, e são sumarizados na Tabela 1.

Para realização da contagem, as regiões de interesse foram delineadas manualmente utilizando uma lente objetiva de 10x. Tendo vista que toda a estrutura cerebelar apresenta-se de forma homogênea em suas secções, e tanto os hemisférios direito e esquerdo, quanto o verme cerebelar, apresentam estruturas histológicas semelhantes⁴³, para contagem de micróglia foi delineado todo o hemisfério cerebelar direito e para contagem de células de Purkinje foram delineadas as camadas de Purkinje localizadas nessa mesma região dos mesmos cortes (Figura 10).

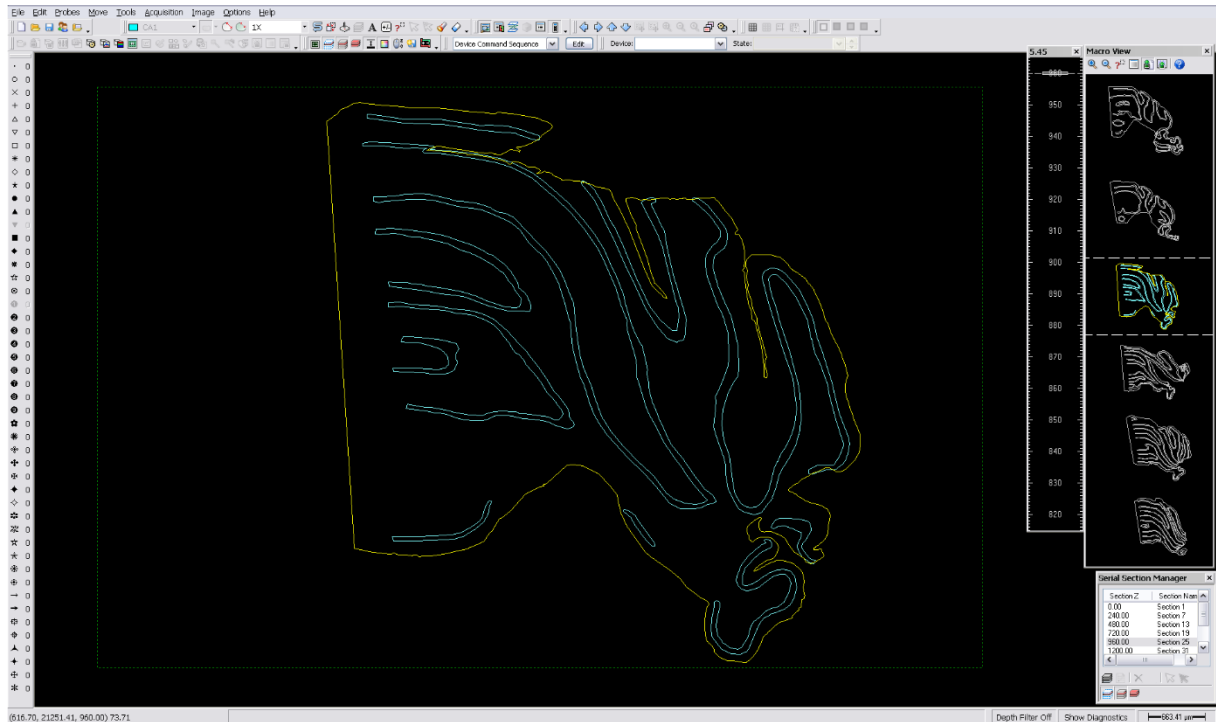


Figura 10 - Interface do software Stereo Investigator com representação da delimitação manual das regiões de interesse para contagem. Linha amarela indicando delineamento de todo hemisfério cerebelar direito, onde foi realizada contagem de células da micróglia; na parte interna, a linha azul indicando o delineamento das camadas de Purkinje, onde foram contabilizadas as células de Purkinje. (Fonte: Elaborado pelo próprio autor).

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na análise estereológica.

Especificações	Tipo Celular	
	Células de Purkinje	Micróglia
<i>Espessura do Corte em Criostato</i>	40µm	40µm
<i>Espessura do corte após tratamento</i>	Variou entre 23 – 32µm	Variou entre 23 – 32µm
<i>Secções por animal</i>	6	6
<i>Intervalo entra cada Secção</i>	6 (240µm)	6 (240µm)
<i>Caixa de contagem (Frame)</i>	50µm x 50µm	70µm x 70µm
<i>Espaçamento entre as caixas de contagem (Grid)</i>	400µm x 400µm	600µm x 600µm
<i>Zona de guarda</i>	2µm	2µm
<i>Região delineada para contagem</i>	Camadas de Purkinje, localizadas no hemisfério cerebelar direito	Hemisfério cerebelar direito

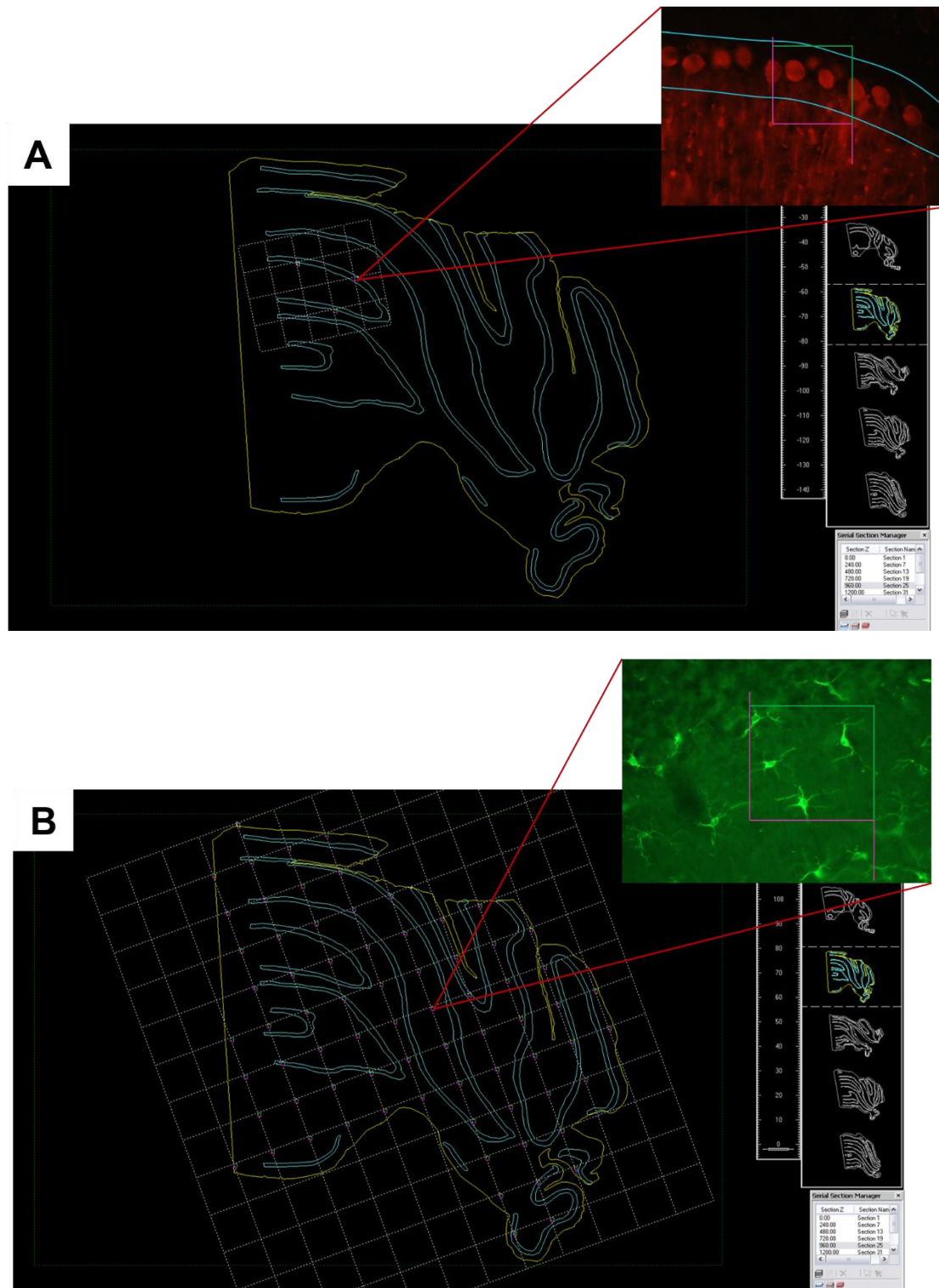


Figura 11 - Interface do software Stereo Investigator com representação de Counting Frames e Grids no hemisfério direito do cerebelo. A) Grid (400µm x 400µm) utilizado sobre a área de contagem nas camadas das células de Purkinje, delimitadas em azul. Em destaque o *Counting Frame* (50µm x 50µm) utilizado na contagem de células de Purkinje (células marcadas em vermelho, objetiva 40x). **B)** Grid (600µm x 600µm) utilizado sobre a área delineada em amarelo para contagem das células da Micróglia. Em destaque *Counting Frame* (70µm x 70µm) utilizado na contagem de células da Micróglia (células marcadas em verde, objetiva 40x). Nos *Counting Frames* as linhas rosas delimitam pontos de exclusão e linhas verdes delimitam pontos de inclusão na contagem das células. Os *Counting Frames* são posicionados nas interseções das linhas dos *Grids* dentro da região de interesse delimitada. (Fonte: Elaborado pelo próprio autor).

A contagem foi realizada com objetiva de 40x. Os nucléolos das células de Purkinje e a parte superior do corpo celular das micróglias que estavam dentro do *counting frame* ou que tocavam suas bordas superior e direita (margens verdes) foram incluídos nas contagens. Para evitar a dupla contagem nos planos x ou y, quando os pontos de referência adotados para contagem das células tocavam as bordas inferior e esquerda da estrutura de contagem (margens rosas), essas células não eram contabilizadas (Figura 11)¹²⁵. Embora células de Purkinje com mais de um nucléolo sejam raras, na ocorrência de casos como esse, optou-se pelo nucléolo de maior diâmetro¹²⁸.

O programa controla os movimentos da platina motorizada (Mbf Bioscience) do microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i) e por consequência da lâmina de microscopia sob observação. Após a contagem se encerrar em um *counting frame* o programa desloca a platina automaticamente para o próximo ponto de intersecção no *grid* e assim subsequentemente, até o pesquisador completar a contagem de todos os *counting frames* no *grid* da região de interesse (Figura 11).

Após finalizadas as contagens o programa gera uma série de dados estatísticos e faz a estimativa total do número de objetos de interesse para cada estrutura (células/mm³) com os respectivos coeficientes de erro.

3.3.5. Histoquímica para estresse oxidativo

Para mensuração do estresse oxidativo foi realizada a detecção indireta do O_2^{\bullet} , que é um dos mais importantes radicais desencadeadores do estresse oxidativo⁹⁰. A presença de O_2^{\bullet} no tecido nervoso foi determinada utilizando-se o reagente dihidroetidina (DHE), que se difunde livremente através das membranas celulares e reage com o O_2^{\bullet} (oxidação de dihidroetidina) formando etidina, que por sua vez intercala-se no DNA fornecendo fluorescência nuclear^{129,130}.

Os cortes de cerebelo foram lavados, sob agitação leve, 3x de 5min com PB 0,1M/pH7,4 para remoção da solução *antifreezing*. Em seguida, eles foram incubados por 15min em uma solução de DHE (5 μ M; Sigma D7008) em PB 0,1M/pH7,4 e lavados 3x de 5min com PB 0,1M/pH7,4 sob agitação leve. Então, os cortes foram incubados por 10min em solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol; 0,57 μ M; Sigma D9564) em PB 0,1M/pH7,4 e lavados 3x de 5min com PB 0,1M/pH7,4 sob agitação leve. Eles foram montados em lâminas e após

secagem parcial, as lâminas foram fechadas com Fluoromount-G (SouthernBiotech 0100-01) e lamínula.

Para a análise de DHE foram selecionadas três fatias do hemisfério direito do cerebelo, todas contendo o lóbulo I. Em cada fatia foram capturadas 5 imagens do lóbulo I, obtendo um total de 15 imagens por animal dessa região. As imagens foram capturadas usando um microscópio confocal com a objetiva de 20X (Zeiss, LSM 780). Para garantir que as imagens obtidas do lóbulo I eram representativas para a condição analisada, outras áreas (lóbulos) do cerebelo foram verificadas como controle. A fluorescência da etidina foi detectada com filtro de excitação de 510-560nm (nanômetro) e filtro de emissão de 590nm, enquanto a fluorescência do DAPI foi detectada com filtro de excitação de 330-380nm e filtro de emissão de 420nm. Foi feita a análise da “pixelação” (densidade integrada) das imagens digitalizadas usando o programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA; versão 1.50i). Para isso, foram calculados a intensidade de fluorescência da etidina e do DAPI e com os valores obtidos calculou-se a razão entre as fluorescências (normalização da densidade integrada ou fluorescência relativa etidina/DAPI)^{129,130}.

3.4. Análise de Expressão Gênica – TNF- α

3.4.1. Extração de tecido a fresco

Para permitir a posterior realização de técnicas de biologia molecular, uma parte dos animais não foi perfundida. Neste caso, os animais foram eutanasiados por decapitação sem uso de anestésico. Tal procedimento é justificado por evidências na literatura que apontam que a identificação da expressão gênica de fatores relacionados a neuroinflamação crônica, podem ser alterados com a utilização de anestésicos^{131,132}. Após a eutanásia o cerebelo e hipocampo foram dissecados. Especificamente para análise de expressão gênica, o hipocampo também foi utilizado, pois dados da literatura apontam, nessas estruturas, aumento dos níveis de TNF- α a longo prazo, induzidos por administração de LPS¹³³.

3.4.2. Isolamento de RNA

O RNA foi extraído de tecido nervoso (cerebelo e hipocampo) utilizando-se Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) e seguindo o protocolo do fabricante. Adicionou-se 1mL de Trizol ao tecido dissecado que foi incubado por 10min à temperatura ambiente (20°C a 25°C), em seguida os tecidos foram macerados e homogeneizados mecanicamente. Foram adicionados 200µL de clorofórmio (Synth, Diadema, Brasil) em cada amostra e estas foram incubadas de 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12000xg (Centrífuga modelo 5804R Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 4°C por 15min.

Após a centrifugação, a mistura separa-se em uma fase mais densa de coloração rosa (fenol-clorofórmio) no fundo do tubo contendo as proteínas, uma interface branca (DNA precipitado) e uma fase sobrenadante aquosa (incolor) onde está contido o RNA. A fase aquosa foi transferida para outro tubo de microcentrífuga com cuidado e o RNA foi precipitado adicionando-se 500µL de isopropanol (Synth). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10min e, em seguida, transferidas para tubos plásticos de 1,5mL onde foram incubadas à temperatura de -20°C por 20-24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000xg, a 4°C por 10min. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* de RNA foram lavados com etanol 75% gelado (Synth). Essa mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 12000xg a 4°C por 10min. Ao final desse processo, os *pellets* de RNA foram deixados secar em temperatura ambiente. No dia seguinte foram ressuspensos em água livre de RNase, incubados a 60°C por 15min e então armazenados a -80°C até o momento do uso.

Uma alíquota de 2µL, de cada amostra, foi usada para quantificação do RNA utilizando-se o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Após a quantificação, as amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris-acetato-EDTA: Tris 40mM, Ac. Acético 20mM, EDTA 1mM), com voltagem de 80V por 45min, para avaliar a integridade do RNA extraído.

3.4.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando 2µg de RNA total. As amostras foram tratadas com RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, USA) seguindo as recomendações do fabricante, tendo no final um volume de 10µL. Para a transcrição reversa foi utilizado 1µL de 0,5mM de Oligo(dT)15 Primer (Promega), incubado por 5min a 70°C, seguido por 5min a 4°C. Após esse período de incubação, foram adicionados às amostras: 0,5µL de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), 1µL de desoxinucleotídeo trifosfato 10mM (dNTP; Promega), 1µL de ImProm-II Antisense Transcription System (Promega), 4µL do tampão da enzima e 1,5µL de MgCl₂ 25mM, tendo um volume final de 20µL. As condições de amplificação utilizadas no termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Applied Biosystems) foram: 25°C por 5min, 42°C por 60min, 70°C por 15min. Ao término da síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20°C.

3.4.4. Amplificação dos genes de interesse

Os *primers* que foram utilizados para as reações de amplificação foram desenhados com o auxílio da ferramenta PrimerQuestSM (www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest) com base nas sequências obtidas de banco de dados do site PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_012675.3).

Após o desenho, os *primers* foram analisados quanto à sua homologia utilizando-se o Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT- Iowa, EUA) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências dos primers de TNF-α utilizados no PCR-real time

	Sequência 5'-3'	TM
Forward	ACCTTATCTACTCCCAGGTTCT	56.3°C
Reverse	GTCAGCCGATTGCGCATTTTC	53.8°C

3.4.5. PCR quantitativa (qPCR)

A reação de PCR quantitativa foi realizada utilizando Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystem - California, EUA) em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Para cada reação, 20ng de cDNA foram adicionados a 5µL de SYBR Green, 0,4µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (10µM) (Tabela 3) e água livre de RNases para completar um volume final de 10µL. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Os ciclos das reações foram constituídos por: 95°C por 10min e 40 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 30seg. A partir das curvas de amplificação geradas, o número de ciclos que passaram o limiar basal, chamado Ct (*Cycle Threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas, foi determinado e aplicado o método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$. Por este método os resultados obtidos na análise do gene de interesse foram comparados com o gene endógeno *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (*Hprt*).

3.5. Análise estatística

Para análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS Statistics (Versão 20.0.0). Os dados da mortalidade foram analisados por meio do teste qui-quadrado de Pearson para comparação entre os grupos e os resultados foram expressos em porcentagem. O teste ANOVA de uma via foi utilizado para análise dos outros parâmetros analisados como: dados da massa corporal, atividade locomotora (teste de campo aberto); fluorescência relativa etidina/DAPI; o quantitativo de células de Purkinje e micróglia (análise estereológica) e a expressão de citocina pró-inflamatória TNF- α (qPCR). Quando aplicável, após o teste ANOVA foi realizado o teste post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas como significativas quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para garantir a escolha adequada do teste estatístico, antes de realizar o teste ANOVA, foram realizados testes para verificação da suposição de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (teste de Levene) dos dados.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da Mortalidade

Para esta análise foram considerados 63 filhotes. Destes, 35 morreram (56%) entre o PN1 e o PN12. A taxa de mortalidade dos filhotes no grupo NAIVE foi 31% (4/13), no grupo SHAM foi 20% (2/10) e no grupo LPS foi de 73% (29/40) (Figura 12).

O teste qui-quadrado de Pearson indicou que a taxa de mortalidade foi significativamente diferente para o fator grupo [$X^2(2) = 13,006$; $p < 0,001$]. Nesta análise, para evitar erros derivados de múltiplas comparações, foi utilizada a correção de Bonferroni que altera o nível de significância (p). O nível de significância corrigido após esse procedimento foi de $p < 0,0083$. Assim, os grupos NAIVE e SHAM não apresentaram diferença significativa na taxa de mortalidade entre eles ($p = 0,045$ e $p = 0,012$ respectivamente). No entanto, observa-se diferença desses grupos com o grupo LPS ($p = 0,003$) (Figura 12).

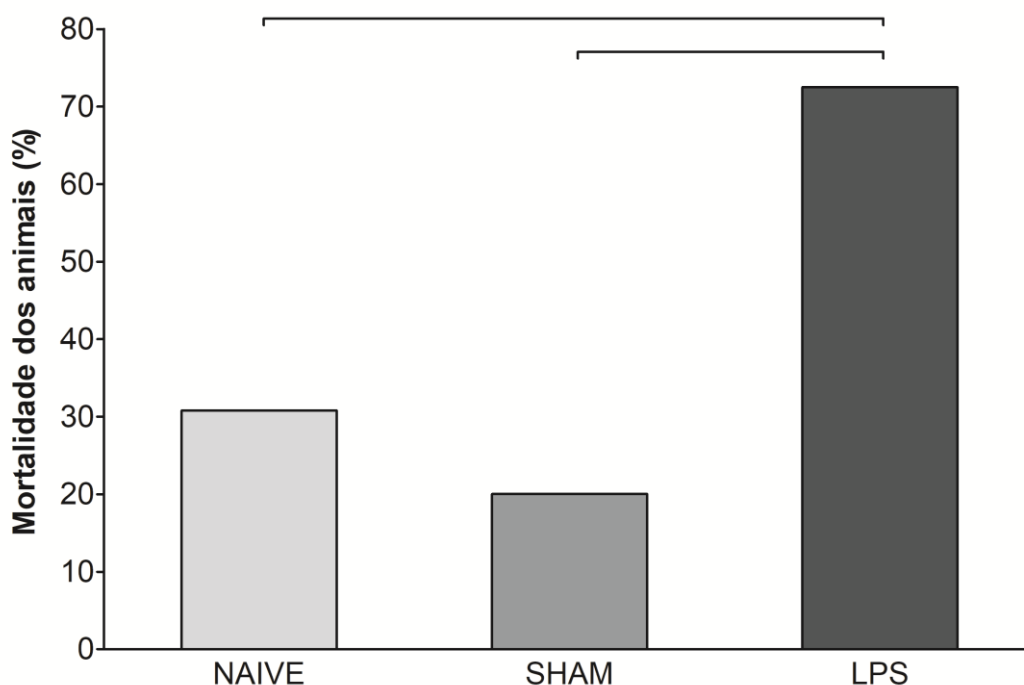


Figura 12 - Mortalidade dos filhotes nos diferentes grupos. Os animais do grupo LPS apresentaram taxa de mortalidade significativamente maior quando comparados com os animais dos grupos NAIVE e SHAM (barras: $p < 0,01$; testes qui-quadrado de Pearson). Nota - LPS: lipopolissacarídeo.

Na Tabela 3 é possível observar o número de animais que completou os protocolos experimentais e foi utilizado para as análises finais em cada grupo.

Tabela 3 - Grupos experimentais e número de animais utilizados para análises finais

Grupos				
Sexo	NAIVE	SHAM	LPS	Total
Machos	9	8	11	28

Nota – LPS: lipopolissacarídeo.

4.2. Avaliação da Massa corporal

A massa corporal dos animais dos grupos experimentais, NAIVE (n=9), SHAM (n=8) e LPS (n=11), foi avaliada em seis momentos (PN3, PN5, PN7, PN21, PN45 e PN89). Foi considerado o ganho de massa, calculando a diferença entre o dia da pesagem e a pesagem anterior, como apresentado na Figura 13.

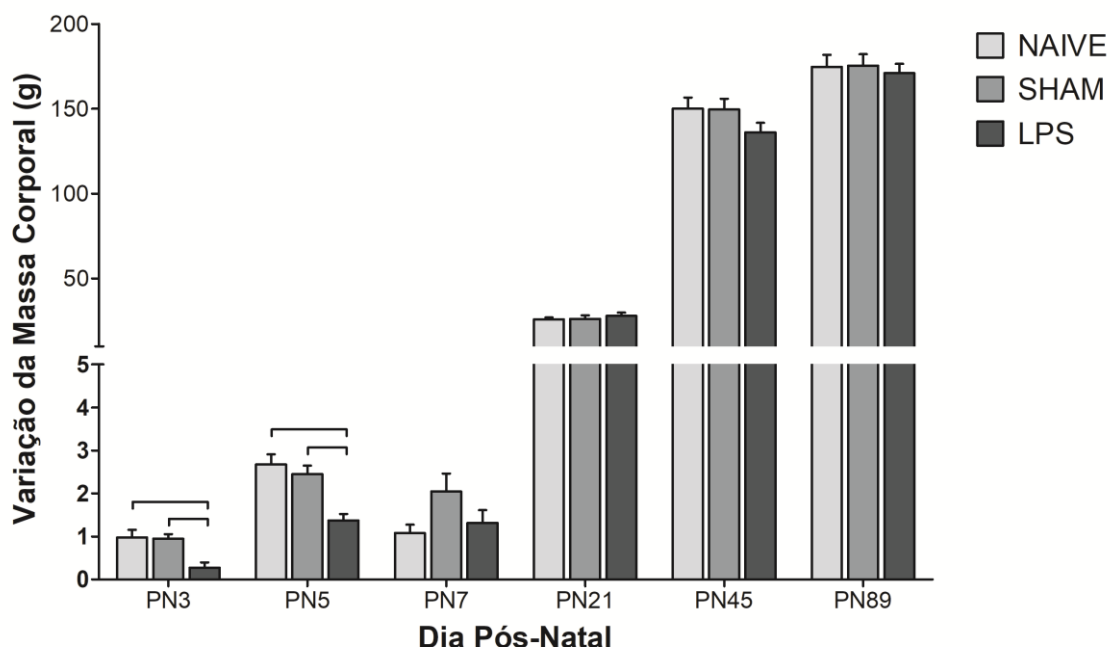


Figura 13 - Variação da massa corporal nos diferentes dias pós-natal por grupo. Houve diferença significativa no ganho de massa corporal dos animais do grupo LPS, em relação aos animais dos grupos controles (NAIVE e SHAM) em PN3 e PN5. No entanto, a longo prazo essas diferenças não foram mais identificadas entre os grupos experimentais (Média±EPM; $p < 0,05$; ANOVA*). Nota – PN: dia pós-natal; LPS: lipopolissacarídeo.

*Embora o teste ideal para essa análise seja ANOVA de medidas repetidas, o referido teste obscurece os resultados no período agudo, por isso, para destacar as variações pelo efeito da inflamação naquele período, optou-se pelo uso do teste ANOVA de uma via.

Foi observado perda de massa corporal nos animais do grupo LPS em relação aos animais dos grupos controles (NAIVE e SHAM) nos dias PN3 [$F(2, 25)= 8,629$; $p= 0,001$; ANOVA] e PN5 [$F(2, 25)= 14,386$; $p<0,001$], no entanto, a longo prazo, essas diferenças não foram mais observadas entre os grupos experimentais [$F(4,800)= 1,657$; $p= 0,161$; ANOVA].

4.3. Avaliação Comportamental

De uma maneira geral, os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferenças quando manuseados e/ou observados. Eles não expressaram vocalização ou comportamento de “luta” para fugir durante a manipulação para pesagem e/ou administração da droga.

A atividade locomotora e o comportamento exploratório foram avaliados por meio do teste de campo aberto. Não foi detectada diferença significativa entre os grupos em qualquer dos parâmetros analisados ($p>0,05$; ANOVA de uma via; Tabela 4), segundo os resultados das comparações específicas: distância percorrida [$F(2, 25)= 1,352$; $p= 0,277$], velocidade [$F(2, 25)= 1,291$; $p= 0,293$], permanência na zona interna [$F(2, 25)= 1,382$; $p= 0,270$] e mobilidade [$F(2, 25)= 0,782$; $p= 0,468$].

Tabela 4 - Teste de campo aberto

Comportamento exploratório e Atividade Locomotora (Média±EPM)			
Parâmetros avaliados	NAIVE	SHAM	LPS
	n=9	n=8	n=11
Distância Percorrida (cm)	5110±110,2	4657,1±240,2	4872±108,7
Velocidade (cm/s)	8,6±0,2	7,8±0,3	8,1±0,3
Permanência na zona interna (s)	29,3±5,9	40,7±6,8	42,7±5,8
Mobilidade (s)	57,5±5,3	51,2±7,2	61,9±5,5

Nota – LPS: lipopolissacarídeo.

4.4. Quantificação de micróglia e células de Purkinje

A técnica de estereologia foi usada para estimar a densidade de células de Purkinje e de micróglias no hemisfério direito do cerebelo. Para isso, foram mensuradas as áreas (μm^2) e estimados os volumes (μm^3) das regiões de interesse para contagem dos dois tipos celulares. Tanto para as camadas de Purkinje (onde

foram contadas as células de Purkinje, Tabela 5), como para o hemisfério direito (onde foram contadas as células da micróglia, Tabela 6) não houve diferença estatística dessas medidas entre os grupos experimentais. Isso mostra que os parâmetros mencionados não interferiram na estimativa da densidade de células.

Tabela 5 - Área e Volume das regiões de contagem das células de Purkinje

Camadas de Purkinje (Média±EPM)			
Grupo	n	Área (μm^2)	Volume (μm^3)
NAIVE	5	$18 \times 10^6 \pm 234$	$4 \times 10^9 \pm 561$
SHAM	4	$18 \times 10^6 \pm 1434$	$4 \times 10^9 \pm 344$
LPS	6	$17 \times 10^6 \pm 801$	$4 \times 10^9 \pm 192$
Estatística		$F(2, 12) = 0,324; p = 0,730$	$F(2, 12) = 0,32; p = 0,730$

Nota – LPS: lipopolissacarídeo; ($p > 0,05$; ANOVA).

Tabela 6 - Área e Volume da região de contagem das células da micróglia

Hemisfério direito do cerebelo (Média±EPM)			
Grupo	n	Área (μm^2)	Volume (μm^3)
NAIVE	5	$137 \times 10^6 \pm 316$	$32 \times 10^9 \pm 758$
SHAM	4	$136 \times 10^6 \pm 539$	$32 \times 10^9 \pm 129$
LPS	6	$126 \times 10^6 \pm 826$	$30 \times 10^9 \pm 198$
Estatística		$F(2, 12) = 0,889; p = 0,436$	$F(2, 12) = 0,889; p = 0,436$

Nota – LPS: lipopolissacarídeo; ($p > 0,05$; ANOVA).

As células de Purkinje foram marcadas com anticorpo anti-calbindina, e na comparação da análise estereológica, não houve diferença significativa entre os grupos [$F(2, 12) = 3,427; p = 0,066$; ANOVA] (Figura 14).

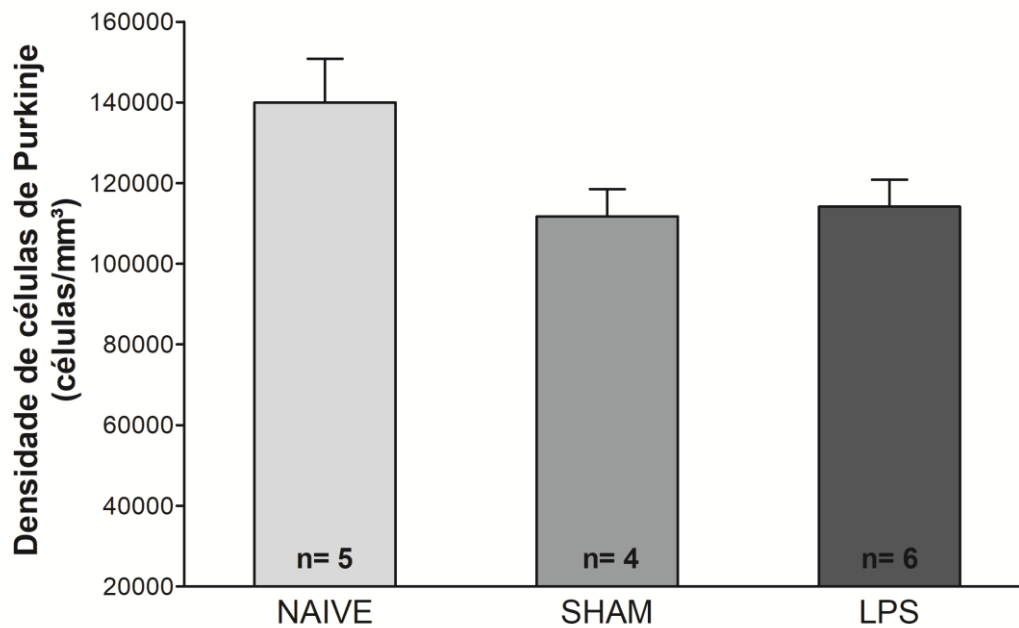


Figura 14 - Densidade de células de Purkinje no hemisfério direito do cerebelo. Não houve diferença significativa na densidade de células de Purkinje entre os grupos. (Média±EPM; $p>0,05$; ANOVA de uma via). Nota - LPS: lipopolissacarídeo.

Ocasionalmente, durante a análise estereológica foi observada a presença de células de Purkinje ectópicas nas camadas molecular e granular, exclusivamente em animais do grupo LPS (Figura 15). As células de Purkinje ectópicas foram observadas na circunvizinhança das monocamadas de Purkinje, próximas aos lóbulos superiores e/ou inferiores (corte coronal), em pelo menos uma ou duas fatias de todos os animais do grupo LPS. O teste exato de Fisher indicou que a presença de células ectópicas foi significativamente diferente entre o grupo LPS e os grupos controles (NAIVE e SHAM) [(2)= 14,135; $p<0,001$]. O reconhecimento das células se deu pelo fato de expressarem características morfológicas típicas.

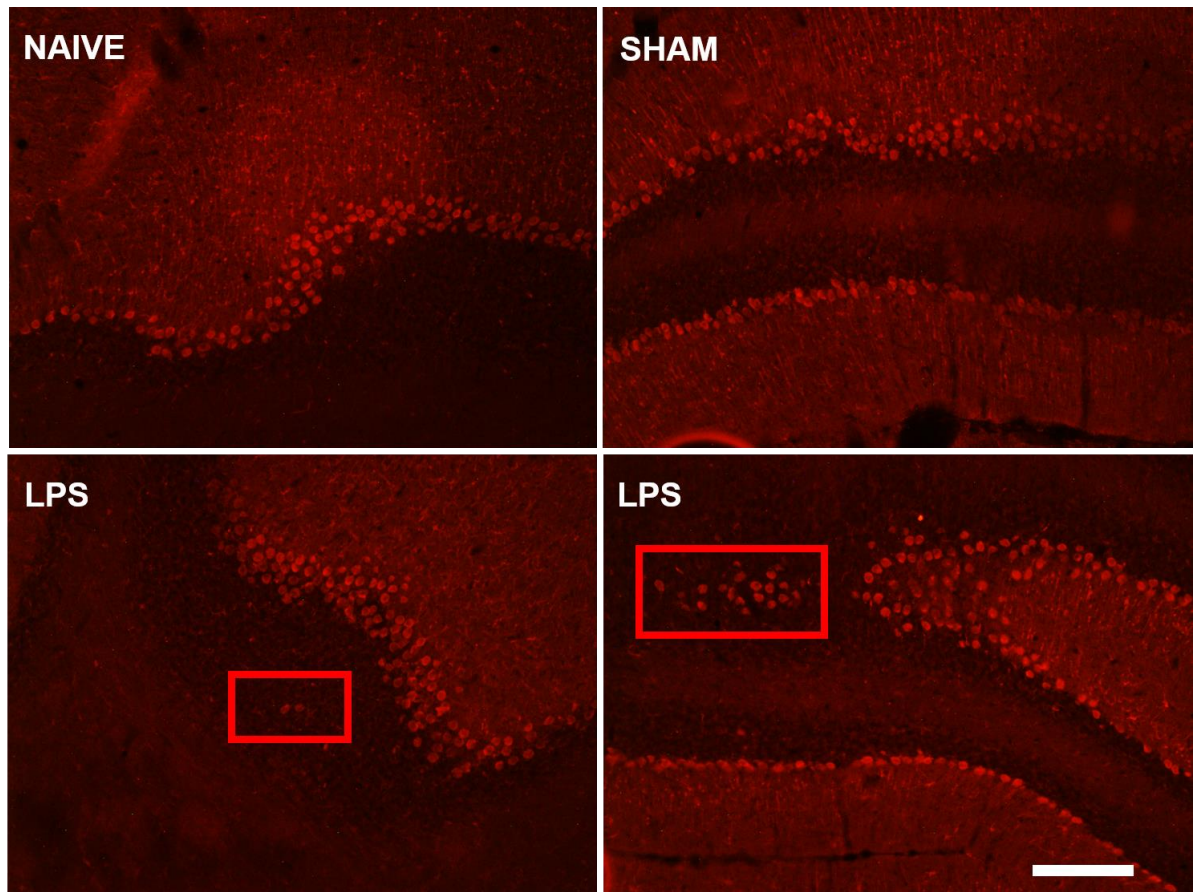


Figura 15 - Fotomicrografia de células de Purkinje no hemisfério direito do cerebelo. Note, em destaque nas imagens, células de Purkinje posicionadas ectopicamente à camada de Purkinje em animais do grupo LPS. Não foram observadas células ectópicas nos grupos NAIVE ou SHAM. Nota – LPS: lipopolissacarídeo; barra de escala: 200µm; objetiva 10x.

As células de micróglia foram marcadas com Iba-1 (Figura 16) e na comparação da análise estereológica, os animais do grupo LPS apresentaram densidade de micróglia maior quando comparados com os animais do grupo NAIVE [$F(2, 12) = 6,927$; $p < 0,010$, ANOVA]. Não foi observada diferença entre os grupos controles NAIVE e SHAM [$F(2, 12) = 6,927$; $p = 0,729$] e apesar de ter havido uma tendência a diferença, o resultado não foi estatisticamente significativo entre os animais do grupo LPS e SHAM [$F(2, 12) = 6,927$; $p = 0,064$] (Figuras 17).

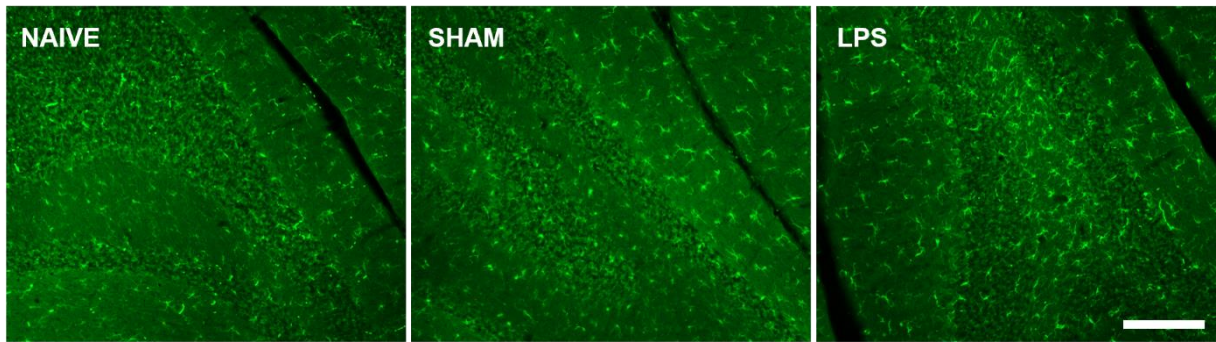


Figura 16 - Fotomicrografia de células de micróglia, marcadas com Iba-1, no hemisfério direito do cerebelo nos diferentes grupos experimentais. Nota – LPS: lipopolissacarídeo; barra de escala: 200µm; objetiva 10x.

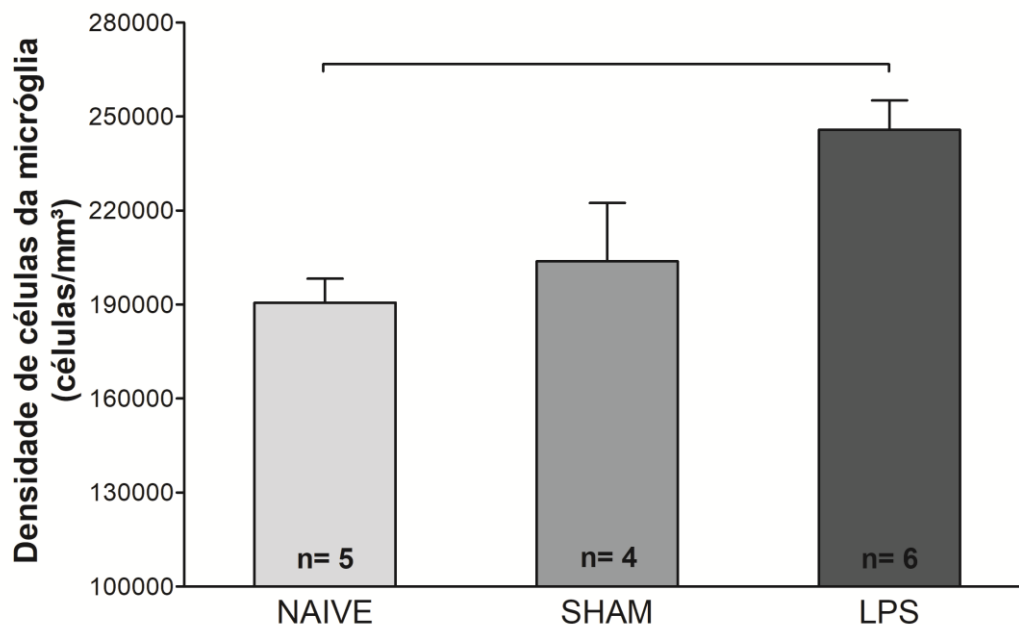


Figura 17 - Densidade de células da micróglia no hemisfério direito do cerebelo. Os animais do grupo LPS apresentaram maior densidade de micróglia quando comparados com os animais do grupo NAIVE. Não houve diferença entre os demais grupos de animais (média±EPM; barra: $p < 0,05$; ANOVA de uma via e *post hoc* de Tukey). Nota - LPS: lipopolissacarídeo.

4.5. Avaliação do estresse oxidativo

A presença do $O_2^{\cdot -}$ foi usada para avaliar o estresse oxidativo no tecido nervoso dos animais dos grupos experimentais, especificamente no lóbulo I do hemisfério direito do cerebelo, através da coloração com etidina. Foi calculada a fluorescência relativa entre etidina e DAPI (Figura 18).

Os animais do grupo LPS apresentaram uma fluorescência relativa etidina/DAPI significativamente maior quando comparados com os animais dos grupos NAIVE e SHAM [$F(2, 11) = 22,100$; $p < 0,0002$, ANOVA] (Figura 19).

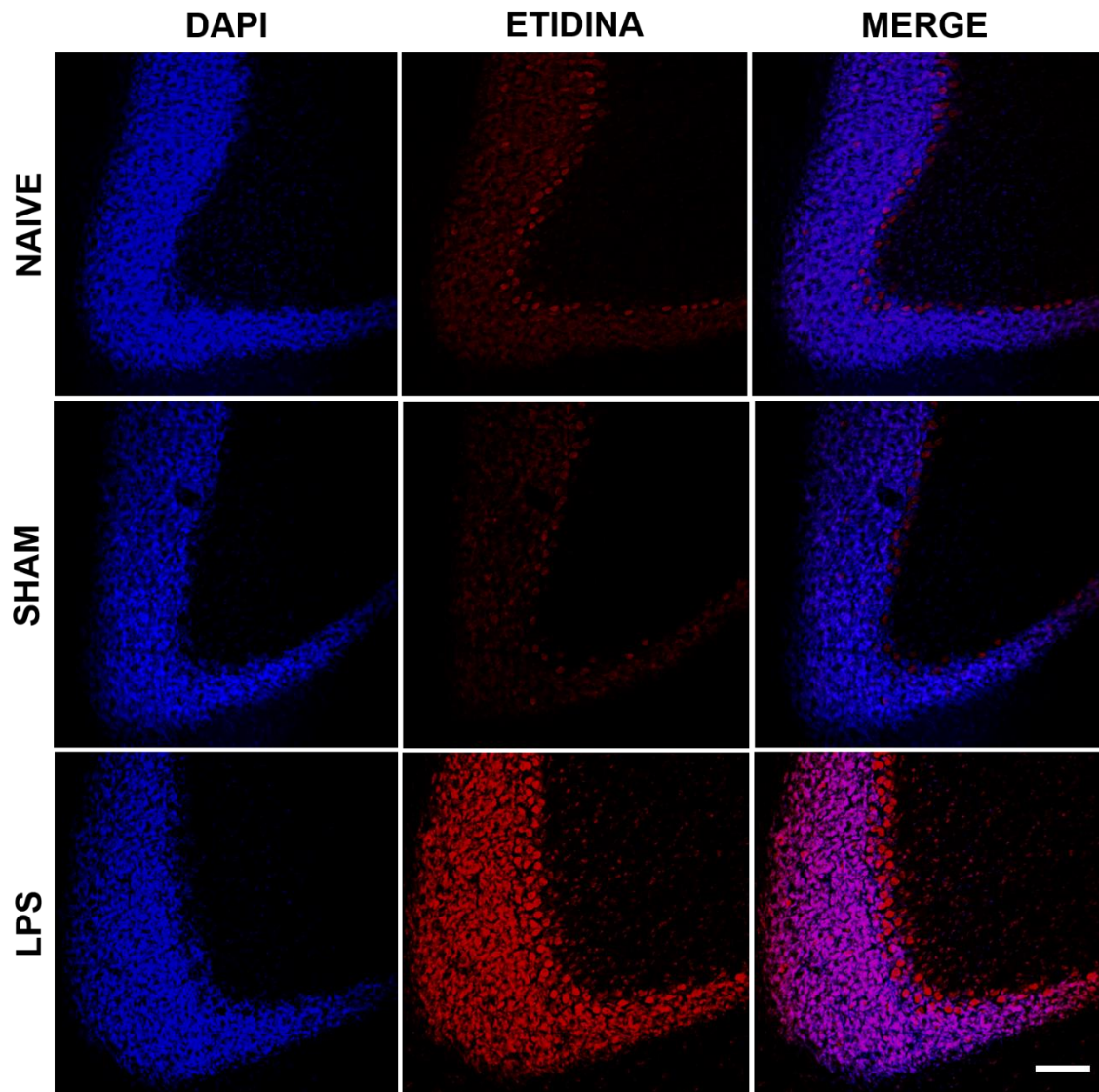


Figura 18 - – Imagens de microscopia confocal da fluorescência do DAPI e da Etidina no lóbulo I do cerebelo. A fluorescência da Etidina é proporcional à concentração do ânion superóxido, um dos responsáveis pelo estresse oxidativo. Animais do grupo LPS apresentaram maior intensidade de marcação com Etidina comparados com grupos NAIVE e SHAM. Nota – LPS: lipopolissacarídeo; barra de escala: 200 μ m; objetiva 20x.

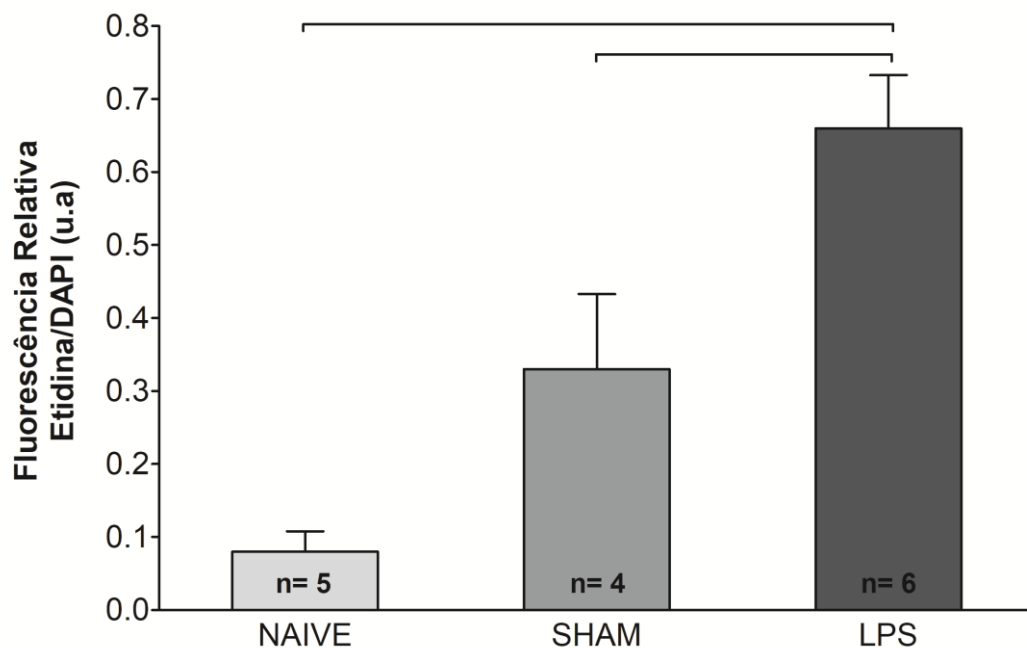


Figura 19 - Fluorescência relativa etidina/DAPI. Os animais do grupo LPS apresentaram uma fluorescência relativa etidina/DAPI significativamente maior quando comparados com os animais dos grupos NAIVE e SHAM. (média±EPM; $p < 0,001$; ANOVA de uma via e *post hoc* de Tukey). Nota – u.a: unidade arbitrária; LPS: lipopolissacarídeo.

4.6. Análise de Expressão Gênica - TNF- α

Foi realizada análise molecular da expressão de RNAm da citocina pró-inflamatória TNF- α no cerebelo. Como mencionado na metodologia, para a análise da expressão gênica, além do cerebelo, também foi analisado o hipocampo.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos na expressão da citocina TNF- α no cerebelo [$F(2, 7) = 2,684$; $p = 0,136$] (Figura 20) e no hipocampo [$F(2, 7) = 0,280$; $p = 0,764$] (Figura 21).

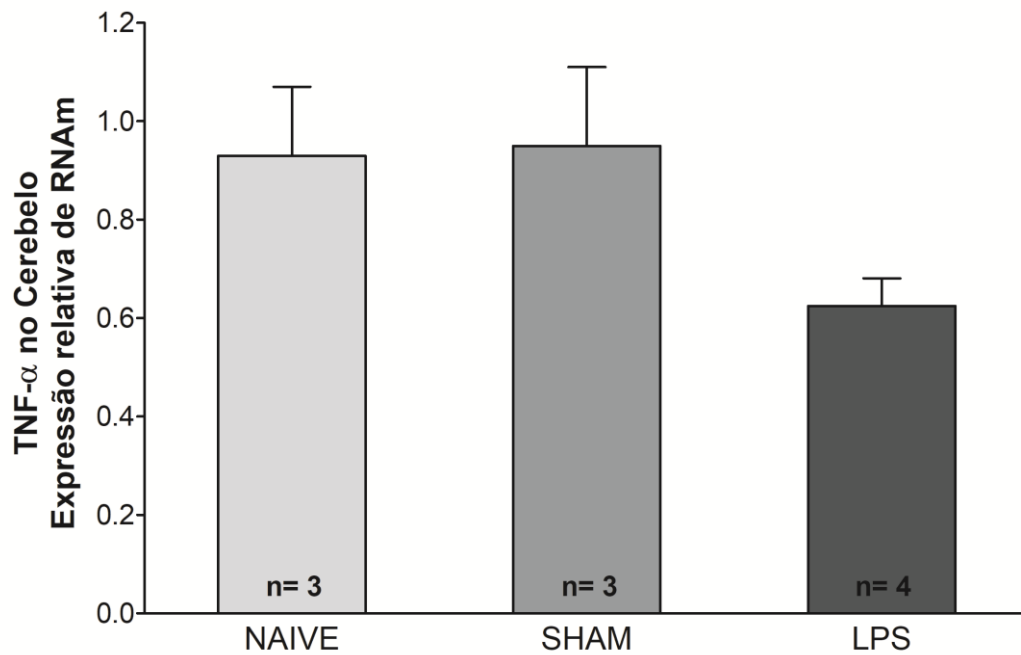


Figura 20 - Expressão Relativa de RNAm para TNF- α no cerebelo. Os grupos não apresentaram diferença significativa para expressão de TNF- α no cerebelo. (Média \pm EPM; $p>0,05$; ANOVA de uma via). Nota - LPS: lipopolissacarídeo.

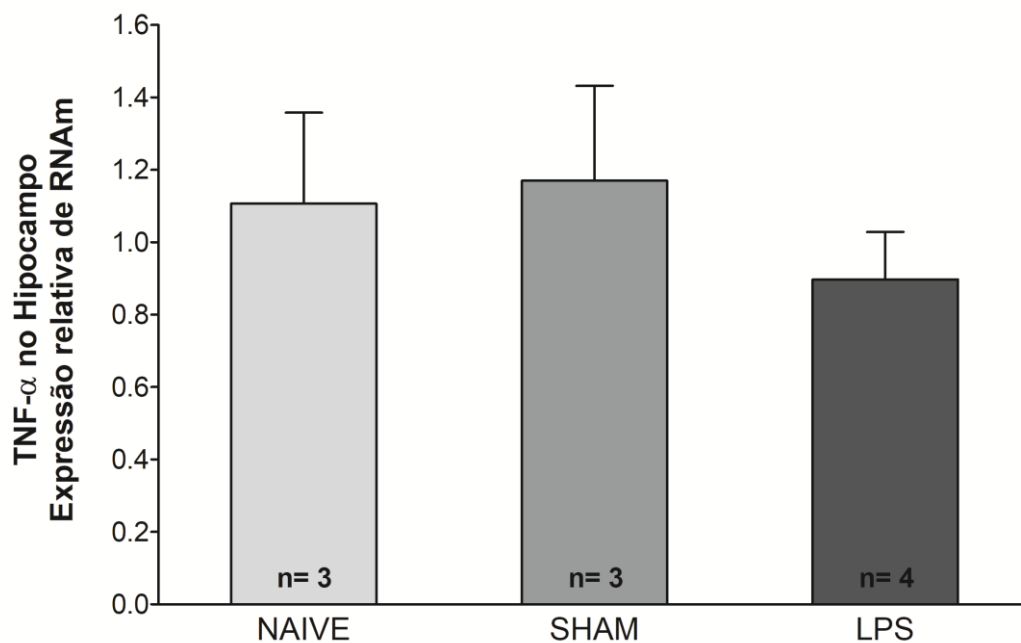


Figura 21 - Expressão Relativa de RNAm para TNF- α no hipocampo. Os grupos não apresentaram diferença significativa para expressão de TNF- α no hipocampo. (Média \pm EPM; $p>0,05$; ANOVA de uma via). Nota - LPS: lipopolissacarídeo.

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado tendo como objetivo avaliar os efeitos da inflamação sistêmica induzida por LPS no período neonatal, sobre o cerebelo de ratos adultos. Verificamos que animais tratados com LPS apresentaram maior mortalidade durante o período neonatal. No entanto, a longo prazo, não foram observadas alterações na massa corporal, na atividade locomotora e exploratória, e na expressão de citocina inflamatória (TNF- α) no cerebelo desses animais. Histologicamente, na fase adulta, animais do grupo LPS apresentaram estresse oxidativo e maior densidade de micróglia no cerebelo e, embora a densidade de células de Purkinje não tenha sido alterada, foram identificadas células de Purkinje ectópicas nesses animais.

O período neonatal é um estágio crucial no desenvolvimento neurológico¹, e um período marcado por grande plasticidade e reorganização neuronal¹³⁴. Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para demonstrar que intervenções próximas ao nascimento, sejam elas pré ou neonatais, podem gerar alterações que perduram ao longo da vida. A administração de LPS no período neonatal produz um estímulo imunológico estressante¹³⁵ capaz de estimular a expressão aguda de citocinas e interferir na maturação do SNC, causando atrofia neuronal, atraso na mielinização e gliose reativa aguda^{136,137}.

Neste estudo, os animais expostos a estímulos inflamatórios sistêmicos na primeira semana de vida apresentaram uma taxa alta de mortalidade quando comparada com a dos grupos controles (NAIVE e SHAM). A alta mortalidade dos animais tratados com LPS pode ser justificada pelo fato do LPS poder desencadear a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que é caracterizada por excessiva síntese de citocinas, dano e morte celular e lesão tecidual aguda e que, em última instância, pode resultar na síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e morte^{6,138}.

Além disso, no trabalho de Weber¹³⁹ foi demonstrado que a mortalidade de filhotes em camundongos é constantemente associada a canibalismo ou mesmo infanticídio, sugerindo que a fêmea mata ativamente seus descendentes. Andersen e Tufik¹⁴⁰, afirmam que quando o número de filhotes excede o limite físico da mãe, ela reduz o tamanho de sua ninhada rejeitando os fracos ou doentes via infanticídio seletivo. Embora, em nosso trabalho, tenhamos padronizado as ninhadas para evitar excesso de filhotes, a administração de LPS ocasionou prejuízos, como, por exemplo, a perda de peso nos primeiros dias de vida, e de alguma forma as mães

podem ter detectado os filhotes doentes, e consequentemente oferecido menos cuidados ou abandonando-os em relação ao restante da ninhada, o que pode ter favorecido a evolução desses animais para morte. Infelizmente, não foi possível avaliar o efeito da adoção cruzada sobre a taxa de mortalidade dos filhotes, embora, acreditamos que esse procedimento não tenha interferido na sobrevivência dos animais. Para maiores esclarecimentos a respeito dessas possibilidades, novos experimentos devem ser realizados, não sendo este, no momento, o objetivo desse estudo.

Além da mortalidade dos animais do grupo LPS, também registramos algumas mortes nos grupos controle, nesses casos a in experiência da mãe quanto aos cuidados com a prole pode ter contribuído para essas ocorrências, já que mães primíparas podem usar excesso de força ao transportar os filhotes de um lugar para o outro na montagem de um novo ninho, e privar os filhotes de amamentação por certos períodos, como apontado por estudos como o de Cohen e Bridges¹⁴¹, que mostram que a experiência materna afeta a responsividade comportamental das fêmeas em relação aos filhotes.

Embora a inflamação neonatal tenha retardado o ganho de peso dos animais na fase aguda, que como mencionado possivelmente favoreceu a evolução de alguns desses animais para o óbito, esse déficit foi superado ao longo do desenvolvimento dos animais sobreviventes. Achados semelhantes aos nossos foram encontrados por Lunardelli¹⁴², que descreveu que a aplicação de LPS na fase neonatal não afetou o peso corporal em camundongos adultos. Corroborando com esses resultados, Spencer¹⁴³ mostra não ter qualquer diferença na evolução da massa corporal ao longo do desenvolvimento, em ratos submetidos à aplicação de LPS (100 µg/Kg) em três diferentes dias (PN3, 7 ou 14). Também em convergência com nosso trabalho, Silva⁶, utilizando o mesmo protocolo experimental, não identificou diferença no ganho de peso ao longo do desenvolvimento de ratos machos e fêmeas. Em contrapartida, encontramos na literatura apenas um trabalho que apresentou dados divergentes, Iwasa e colaboradores¹⁴⁴ demonstraram que há aumento do peso corpóreo, da ingestão de alimento e da concentração de leptina sérica em ratos adultos submetidos à administração de LPS no período neonatal (PN 10). O período neonatal é crucial para o desenvolvimento dos circuitos neuronais que controlam alimentação e saciedade, como o circuito regulatório hipotalâmico, que podem sofrer alterações em decorrência da inflamação^{6,145}. A massa corporal é mais um indicador dos efeitos da inflamação, que podem perdurar

ou não ao longo da vida. Em nosso estudo, a inflamação neonatal não teve consequências duradouras relativas à massa corporal dos animais.

A inflamação sistêmica neonatal pode acarretar consequências bioquímicas e histológicas negativas no sistema nervoso. Sabe-se que a exposição pré e pós-natal de ratos a diferentes substâncias tóxicas tem efeitos deletérios no desenvolvimento do cerebelo¹⁴⁶. Correa e colaboradores¹⁴⁷ demonstraram que, em neonatos, 24h após a administração sistêmica de LPS ocorre aumento dos níveis da enzima SOD e de outras proteínas associadas a sistemas antioxidantes no tecido nervoso, o que é indicativo de aumento do estresse oxidativo. Em modelos animais, a presença de estresse oxidativo no cerebelo influencia a vulnerabilidade das células de Purkinje ao dano, podendo causar prejuízos no neurodesenvolvimento cerebelar¹⁴⁶. Insultos oxidativos nessa região também resultam em rápida mudança nas células da glia¹⁴⁸, além de reduções de proteínas importantes para a função cerebelar: proteínas terminais pré-sinápticas (sinapsina-1), proteínas para manutenção do tamanho, forma e qualidade axonal (neurofilamentos) e proteínas envolvidas na neurotransmissão GABAérgica¹⁴⁸.

No presente trabalho foi observado que animais expostos à inflamação sistêmica na fase neonatal ainda apresentam estresse oxidativo elevado quando adultos. Resultado semelhante, utilizando o mesmo protocolo experimental, foi verificado no giro denteado do hipocampo⁶.

Corroborando esses achados, MacRae e colaboradores¹⁴⁹ evidenciaram que a administração periférica de LPS em ratos no PN3 e PN5 levou a um aumento de glutathione peroxidase no tecido nervoso quando avaliado no PN40, PN70 e PN90, possivelmente indicativo de um mecanismo compensatório contra o estresse oxidativo.

Coincidente com níveis elevados de estresse oxidativo, animais adultos submetidos a LPS no período neonatal também apresentaram maior densidade de micróglia no cerebelo quando comparados a animais do grupo NAIVE, e uma tendência a diferença ($p=0,06$) comparada ao grupo SHAM.

A micróglia é altamente sensível a qualquer perturbação no microambiente neuronal e sua ativação ocorre gradualmente, podendo voltar a qualquer momento ao estado de repouso, mediante suspensão do estímulo^{6,104}. Inicialmente, a micróglia ativada expressa vários receptores e moléculas de adesão, pode entrar em replicação aumentando em número, e, posteriormente, se o estímulo persistir, pode

adquirir capacidade de célula apresentadora de antígenos, fagocítica e pró inflamatória, por meio da secreção de citocinas e quimiocinas¹⁵⁰, além disso a ativação microglial também leva à produção de radicais superóxido, NO e componentes do sistema complemento¹⁵¹. A micróglia ativada por diversos estímulos muda sua morfologia e perfis de expressão de citocinas/quimiocinas e função¹⁵².

Segundo Pang e colaboradores¹⁵³ a exposição neonatal ao LPS sistêmico leva a uma ativação aguda da micróglia caracterizada por alteração fenotípica (hipertrofia do corpo celular, retração de prolongamentos adquirindo aspecto ameboide com formato irregular), principalmente em regiões como corpo caloso, cíngulo, áreas periventriculares e hipocampo.

Recentemente, foi demonstrado que animais que receberam uma única injeção de LPS sistêmico no PN7, apresentaram aumento de células apoptóticas, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e ativação microglial no tecido cerebral que persistiram até 7 dias após a administração de LPS¹⁵⁴.

Agudamente, foi observado que a estimulação de culturas organotípicas cerebelares com LPS, provoca ativação de micróglia e liberação de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando desmielinização e dano axonal¹⁵⁵. Corroborando esses achados, Nakki e colaboradores¹⁵⁶, relataram danos às células de Purkinje, bem como ativação microglial no vermis cerebelar após a administração de fenticlidina, agente neurotóxico, *in vivo*. Cutando e colaboradores¹⁵⁷, em convergência com esses trabalhos, observaram ativação da micróglia cerebelar e aumento na expressão de marcadores neuroinflamatórios após administração de THC (delta tetrahydrocannabinol, componente psicoativo da cannabis), em camundongos.

A longo prazo, Wang e colaboradores¹⁵⁸ demonstraram que a exposição neonatal ao LPS foi associada ao comprometimento da memória aversiva e alterações hipocampais como redução no volume, lesões axonais de neurônios, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento do número de micróglia quando os animais completaram 70 dias de vida. Corroborando esses achados, outro estudo verificou que o aumento do número de micróglia no hipocampo, córtex cerebral e tálamo, teve início dois dias após a injeção de LPS e foi persistente até a idade adulta¹⁵⁹.

Qin e colaboradores¹⁶⁰, observaram aumento no número de micróglia na substância negra 10 meses após uma única dose de LPS ser aplicada em

camundongos adultos. O aumento na densidade de micróglia foi acompanhado por aumento da expressão de TNF- α e de outras proteínas inflamatórias e diminuição do número de neurônios nessa estrutura. Stolp e colaboradores¹¹⁰, detectaram aumento da densidade de astrócitos, na substância branca 8 semanas após administração neonatal de LPS (PN0, 2, 4, 6 e 8).

A hipótese sugerida para explicar esses achados seria que subconjuntos de células gliais ficam permanentemente mantidas em um estado ativado após um insulto no período neonatal^{158,161}. Utilizando análise visual não foi possível detectar alterações perceptíveis de morfologia que indicassem o estado ativado ou não das micróglias no presente estudo. Entretanto, a maior densidade de micróglia no cerebelo dos animais tratados com LPS suporta a hipótese apresentada. Esse dado é relevante, uma vez que não encontramos na literatura outras referências sobre ativação de micróglia a longo prazo, no cerebelo, após estímulo com LPS.

Somado a isso, e como já mencionado, tanto o estresse oxidativo, como a atividade de células gliais, podem influenciar a secreção de citocinas inflamatórias, e também serem influenciados por elas.

No presente estudo, não identificamos alterações nos níveis de RNAm para TNF- α no hipocampo e cerebelo de animais adultos, após tratamento com LPS no período neonatal.

A expressão de TNF- α , e também outras citocinas, são em sua grande parte pesquisadas na fase aguda após insulto com LPS. Christensen e colaboradores¹⁶², inocularam LPS diretamente nos hemisférios cerebrais, de camundongos neonatos (PN2) e jovens (PN21) e identificaram 12h após inoculação, diversas citocinas, entre elas o TNF- α , em níveis maiores no tecido cerebral neonatal do que no tecido cerebral dos camundongos jovens. As citocinas testadas no estudo de Christensen e colaboradores foram indetectáveis em períodos posteriores a 24, 48 ou 72h nos dois grupos de animais. Por outro lado, segundo o estudo de Weberpals e colaboradores¹⁶³, foi observado, 24h após a administração periférica de LPS em camundongos adultos, um aumento do RNAm de TNF- α no córtex, hipocampo e cerebelo.

Puntener e colaboradores¹⁶⁴, que administraram LPS i.p. em camundongos adultos durante três dias consecutivos, observaram que a primeira dose de LPS induziu altos níveis de citocinas sistêmicas, entre elas TNF- α , com alterações comportamentais associadas. A segunda dose de LPS, induziu níveis significativos

de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo, apesar da redução da expressão de citocinas periféricas. E a terceira dose subsequente com LPS resultou em uma síntese reduzida de citocinas sistêmicas e no encéfalo, indicativo de tolerância em ambas as regiões. Similarmente, outros estudos não encontraram alterações comportamentais e de marcadores inflamatórios no córtex de animais submetidos a sucessivas injeções de LPS i.p. Não acreditamos que tenha havido desenvolvimento de tolerância às injeções de LPS, pois o protocolo em dias alternados utilizado no presente estudo reduz o efeito de dessensibilização de múltiplas doses de LPS¹¹⁰.

De fato, poucos estudos avaliam a expressão crônica de citocinas inflamatórias no tecido nervoso após injeção de LPS¹⁶⁵. Corroborando com nossos resultados, Walker e colaboradores¹⁶⁶, reportaram que a ativação imune sistêmica por LPS no período neonatal (PN3 e PN5) não alterou os níveis de TNF- α no hipocampo de animais adultos (PN85). Aumento nos níveis de TNF- α e IL1 β foram verificados apenas nos animais adultos submetidos a um segundo estímulo estressor momentos antes da eutanásia¹⁶⁶.

Por outro lado, estudos que realizaram a estimulação com LPS em animais já adultos ou até mesmo idosos encontraram resultados divergentes. Qin e colaboradores¹⁶⁰, descrevem que os níveis circulante e encefálico de TNF- α aumentam logo após insulto com LPS em animais adultos, e cronicamente permanecem elevados no encéfalo, embora diminuam no sangue. Fu e colaboradores, relataram aumento de RNAm para TNF- α no hipocampo 30 dias após administração de LPS em animais idosos, mas não observaram aumento de TNF- α proteico ou aumento de astrócitos nesse mesmo período.

Bossù e colaboradores¹³³, administraram uma única dose de LPS i.p. em ratos machos adultos, e posteriormente realizaram análises de citocinas em dois momentos (7 dias e 10 meses), relataram que no 7º dia após aplicação de LPS, níveis de TNF- α foram significativamente maiores nos animais LPS do que nos controles, na região do hipocampo e do córtex frontal, e não foram encontradas diferenças no cerebelo, estriado e hipotálamo. Interessante que 10 meses após administração de LPS, ainda foi observado níveis maiores de TNF- α no hipocampo e córtex frontal, e também no cerebelo¹³³.

A revisão de Lopes¹⁶⁵ considera que tanto a dose como o tempo de análise após a injeção de LPS são fundamentais para o estudo de seus efeitos neuroinflamatórios. De fato, apenas o trabalho de Walker e colaboradores¹⁶⁶,

investigou a expressão de citocinas inflamatórias a longo prazo após injeção de LPS no período neonatal. As outras referências utilizaram animais já adultos e até mesmo idosos no momento da aplicação do LPS. Portanto, é possível que a idade do animal no momento da injeção de LPS realmente tenha forte influência nos resultados encontrados. Não descartamos, entretanto, que outras citocinas inflamatórias possam estar alteradas em nossos animais.

A perda celular (morte) é a consequência final observada na exposição a uma neurotoxina¹⁶⁷. Quando analisamos a influência da inflamação sistêmica neonatal sobre um dos principais tipos neuronais que compõem o cerebelo, as células de Purkinje, não identificamos perda significativa destas células nos animais LPS adultos.

É relatado na literatura que insulto com LPS neonatal pode alterar o número de neurônios nos animais adultos em diversas estruturas: substância nigra¹⁷⁰, hipocampo, córtex cerebral, tálamo^{153,154,169,170}, substância branca¹¹⁰. Diferentes estudos também relatam que outros tipos de insultos experimentais no período neonatal (p. ex. inalação de álcool, infecção viral/bacteriana, asfixia/hipóxia) podem levar à danos e/ou morte de células de Purkinje em animais adultos¹⁷¹⁻¹⁷³, entretanto, não encontramos na literatura análises de perda neuronal no cerebelo a longo prazo, após administração de LPS neonatal.

Embora nossos resultados não mostrem perda significativa de células de Purkinje no cerebelo, identificamos durante a contagem estereológica a ocorrência de células de Purkinje ectópicas exclusivamente nos animais do grupo LPS, sugerindo que a exposição ao LPS causou algum impacto sobre essas células.

Os primeiros estágios do desenvolvimento das células de Purkinje incluem sua migração do neuroepitélio ventricular para o córtex e sua segregação em uma lâmina celular única sob a camada germinativa externa³⁹. Falhas nessas etapas podem levar ao mau posicionamento das células de Purkinje nas camadas molecular e granular do cerebelo. Células de Purkinje deslocadas na camada molecular do cerebelo foram inicialmente relatadas por Cajal (1911) em roedores. Posteriormente Estable (1923) também relatou células de Purkinje isoladas na camada granular¹⁷⁴. A existência de células ectópicas de Purkinje tem sido relatada tanto em situações patológicas, como na síndrome de Zellweger, um distúrbio hereditário da migração neuronal com efeitos notáveis nas células de Purkinje; em algumas condições experimentais, como exposição à radiação-X, que produzem

uma perturbação notável da neurogênese cortical do cerebelo; como também em condições fisiológicas, embora muito pouco se saiba sobre esta possibilidade¹⁷⁴.

Os sinais moleculares ditam a localização definitiva da célula de Purkinje na impressionante arquitetura de monocamada. Acredita-se que a glicoproteína reelina esteja diretamente ligada a migração e posicionamento de células durante o desenvolvimento²⁸. A reelina é uma glicoproteína da matriz extracelular secretada durante a neurogênese e representa a primeira molécula de uma cascata intracelular complexa que regula a migração neuronal em estágios críticos de desenvolvimento¹⁷⁵. No cerebelo, os precursores de células granulares expressam a reelina, enquanto as células de Purkinje expressam seus sítios de ligação, incluindo ApoER2, VLDLR e Dab1^{176,177}.

Os precursores da camada granular externa requerem a expressão do *Sonic hedgehog*, que é fornecido pelas células subjacentes de Purkinje, para expandir a população de neurônios granulares no período pós-natal. Assim, o arranjo das células de Purkinje durante o desenvolvimento embrionário é um evento histogenético chave, e conseqüentemente, determina o volume cerebelar global, o padrão de foliação e a intensidade da associação entre células de Purkinje e granulares¹⁷⁸.

Durante o desenvolvimento cerebelar de camundongos, a expressão de reelina (mRNA e glicoproteína) é primeiro detectada em E13. Na primeira semana de vida pós-natal, a expressão de reelina desaparece das áreas profundas, mas é mantida nos precursores de células granulares, e a expressão de reelina pode continuar em algumas células granulares de camundongos adultos¹⁷⁹.

Nakamura e colaboradores¹⁸⁰ realizaram estudos em camundongos *knockout* para a região C-terminal de reelina, e confirmaram que a interrupção da sinalização de reelina causa a localização ectópica de *pools* de células de Purkinje em camadas profundas do cerebelo. Esses dados são consistentes com achados anteriores que mostraram um papel para os receptores VLDLR e ApoER2 durante a dispersão de subconjuntos distintos, mas sobrepostos de células de Purkinje¹⁷⁶.

Win Darmanto e colaboradores¹⁸¹ em seu estudo demonstraram que o nível de reelina é especificamente reduzido nas camadas granulares externa e interna de ratos que receberam radiação-X no período em que as células de Purkinje imaturas estão em processo de alinhamento (final do período pré-natal e começo do período pós-natal). Portanto, sugere-se que a diminuição de reelina seja a possível causa do

desarranjo das células de Purkinje no cerebelo irradiado. É possível que o processo inflamatório induzido pela administração de LPS neonatal possa ter alterado o nível de reelina e consequentemente ocasionado a localização ectópica das células de Purkinje no presente estudo.

A localização correta das células de Purkinje é importante para a função cerebelar adequada, pois estas células servem como a única via de eferência do córtex cerebelar. Alterações na localização das células de Purkinje podem resultar em doenças do movimento⁵⁰. Além disso, camundongos *knockout* para reelina apresentam importantes déficits motores²⁸. No presente trabalho o número de células de Purkinje ectópicas detectadas em todos os animais do grupo LPS foi pequeno e não sistematicamente quantificado. É possível que a quantidade de células de Purkinje encontradas nas camadas molecular e granular do cerebelo não tenha sido suficiente para ocasionar comprometimento funcional.

No presente trabalho também avaliamos se a inflamação sistêmica neonatal deixaria consequências motoras nos animais adultos. Como mencionado anteriormente, não foi possível realizar satisfatoriamente o teste do Rotarod, sendo assim, utilizamos como alternativa para avaliação da atividade locomotora dos animais o teste de Campo Aberto, que não indicou diferenças entre os grupos em qualquer dos parâmetros comportamentais avaliados.

Este resultado converge com o de outros estudos que também utilizaram teste de campo aberto para avaliação motora após injeção de LPS. Vojtechova e colaboradores (2018) não observaram alterações na atividade locomotora e exploratória espontânea de ratos adultos, depois da aplicação pós-natal (PN5 a 9) de LPS. Da mesma forma Zhu e colaboradores¹⁵⁹ que aplicaram o LPS diretamente no hipocampo no PN7, relataram a locomoção inalterada em ratos adultos.

De maneira semelhante ao resultado aqui encontrado, outros autores utilizando o teste de Rotarod, ratos expostos a injeções de LPS no pós-natal (PN2 a 6) não apresentaram qualquer comprometimento motor significativo em PN60¹⁸². Resultados contrários, foram descritos por Rico e colaboradores¹⁸³ que verificaram hiperlocomoção após tratamento pós-natal com LPS em ratos adolescentes e Girard e colaboradores¹⁸⁴, que encontraram prejuízos na função motora e coordenação em ratos na idade adulta, após empregarem o protocolo de LPS neonatal. Interessante que Bernardi e colaboradores¹⁸⁵, administrando LPS no período neonatal (PN2), observaram redução da atividade geral em Campo Aberto em ratas, mas estes

resultados não foram observados nos machos. Ao contrário, Tenk e colaboradores¹⁸⁶, demonstraram que o tratamento no período neonatal com LPS (PN3 e 5) ocasionou reduções na atividade locomotora em adultos machos, mas não em fêmeas.

Segundo Vojtechova e colaboradores¹⁸⁷, a questão da influência da exposição ao LPS nas alterações da atividade locomotora ainda é uma questão em aberto.

6. CONCLUSÃO

Os animais expostos a estímulos inflamatórios sistêmicos na fase neonatal, tiveram aumento na densidade de células da micróglia e no nível de estresse oxidativo no cerebelo a longo prazo. No entanto, esses animais não sofreram alteração na atividade locomotora na idade adulta, assim como na expressão de TNF- α ou na densidade de células de Purkinje no cerebelo, embora, tenha sido detectada a localização ectópica dessas células. Esses resultados indicam que inflamação neonatal, em período correspondente ao neonato pré-termo humano, pode ter efeitos crônicos no cerebelo. Dada a importância dessa estrutura para funções motoras, executivas e também funções cognitivas e emocionais e sua possível correlação com diferentes patologias é de grande relevância compreender as repercussões e mecanismos pelos quais insultos no período neonatal podem gerar alterações que perduram ao longo da vida, com a finalidade de se aplicar novos estudos e também desenvolver possíveis ações preventivas e terapêuticas.

7. REFERÊNCIAS

1. Rakic P. Principles of neural cell migration. *Experientia* 1990;46:882-91.
2. Jiang X, Nardelli J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiology of disease* 2016;92:3-17.
3. Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron* 2016;89:248-68.
4. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychology review* 2010;20:327-48.
5. Mousa A, Bakhiet M. Role of cytokine signaling during nervous system development. *International journal of molecular sciences* 2013;14:13931-57.
6. Silva CSd. Participação do receptor P2X7 nos efeitos de longo prazo da inflamação sistêmica neonatal: Estresse oxidativo hipocampal, alteração da nocicepção e ansiedade. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2018.
7. Volpe. JJ. Overview:Normal and abnormal human brain development. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 2000;6:1–5.
8. Purves Dea. *Neuroscience*. 3ª ed. ed2004.
9. Zomignani AP, Zambelli HJL, Antonio MÂRGM. Desenvolvimento cerebral em recém-nascidos prematuros. *Rev Paul Pediatr* 2009;27:198-203.
10. Larsen CC, Bonde Larsen K, Bogdanovic N, et al. Total number of cells in the human newborn telencephalic wall. *Neuroscience* 2006;139:999-1003.
11. Ernst A, Alkass K, Bernard S, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 2014;156:1072-83.
12. ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, NORDBORG C, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *NATURE MEDICINE* 1998;4.
13. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 2011;478:382-6.
14. Petanjek Z, Judas M, Simic G, et al. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:13281-6.
15. Lent R, de Neurônios CB. Conceitos fundamentais de neurociência. Atheneu-FAPERJ 2001.

16. Howard BM, Zhicheng M, Filipovic R, Moore AR, Antic SD, Zecevic N. Radial glia cells in the developing human brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2008;14:459-73.
17. Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Frontiers in neuroanatomy* 2009;3:5.
18. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 2011;146:18-36.
19. Taverna E, Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annual review of cell and developmental biology* 2014;30:465-502.
20. Sigaard RK, Kjaer M, Pakkenberg B. Development of the Cell Population in the Brain White Matter of Young Children. *Cerebral cortex* 2016;26:89-95.
21. deAzevedo LC, Fallet C, Moura-Neto V, Daumas-Duport C, Hedin-Pereira C, Lent R. Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *Journal of neurobiology* 2003;55:288-98.
22. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in human neuroscience* 2016;10:566.
23. Harry GJ, Kraft AD. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 2012;33:191-206.
24. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annual review of immunology* 2014;32:367-402.
25. Patro I, Nagayach A, Sinha S, Patro N. General Physiology and Pathophysiology of Microglia During Neuroinflammation. 2016:17-42.
26. Pinheiro M. Aspectos históricos da neuropsicologia: subsídios para a formação de educadores. *Educar em Revista* 2005.
27. Wullstein IAC. Yoga, meditação e silêncio: um estudo na tradição de grandes mestres e na visão científica de Bohdan Wjtenko. 2009.
28. Porcionatto MA. The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006;39:313-20.
29. Limperopoulos C, Plessis AJd. Disorders of cerebellar growth and development. *Curr Opin Pediatr* 2006;18:621–7.
30. Bromley B, Nadel AS, Pauker S, Estroff JA, Benacerraf BR. Closure of the cerebellar vermis: evaluation with second trimester US. *Radiology* 1994;193:761-3.

31. Lemire RJ, Loeser JD, Leech RW, Alvord Jr EC. Normal and abnormal development of the human nervous system. . Hagerstown MD: Harper and Row 1985.
32. Biran V, Verney C, Ferriero DM. Perinatal cerebellar injury in human and animal models. *Neurology research international* 2012;2012:858929.
33. Kiessling MC, Büttner A, Butti C, et al. Cerebellar granule cells are generated postnatally in humans. *Brain Structure and Function* 2014;219:1271-86.
34. Wallauer MM. Efeitos do etanol e do tabaco no cerebelo de ratos wistar. Porto Alegre Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2016.
35. Bertacini PV. Material particulado fino presente no ar da cidade de São Paulo promove alterações nas células de Purkinje: um estudo experimental em embrião de galinha. São Paulo Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2010.
36. Sarna JR, Hawkes R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Progress in Neurobiology* 2003;70:473-507.
37. Zervas M, Millet S, Ahn S, Joyner AL. Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere1. . *Neuron* 2004;43:345-57.
38. Sotelo C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in neurobiology* 2004;72:295-339.
39. Altman J. Morphological Development of the Rat Cerebellum and Some of Its Mechanisms. *Exp Brain Res* 1982;16:8-49.
40. Oliveira SAd. Morfometria do cerebelo de ratos machos ucha e uchb submetidos a separação materna neonatal. Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista; 2008.
41. Fonnum F, Lock EA. Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicology letters* 2000;9:112–3.
42. Xifró X, Rodríguez-Álvarez J. Delineating the Factors and Cellular Mechanisms Involved in the Survival of Cerebellar Granule Neurons. . *Cerebellum* 2015;14:354-9.
43. Damiani D, Gonçalves VP, Kuhl L, Aloí PH, Nascimento AM. Aspectos neurofuncionais do cerebelo: o fim de um dogma. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia* 2016;35:039-44.
44. Machado, A. Neuroanatomia funcional. 2ª ed 2002.
45. Cosenza RM. editor. Fundamentos de Neuroanatomia. 3ª ed. Rio de Janeiro: 2005.

46. 12_Central_Nervous_S. 2019. (Accessed 12/03/2019, 2019, at https://studylib.net/doc/8424124/12_central_nervous_system.)
47. Larsell O. The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum from Monotremes through Apes, 1970.
48. Barlow JS. The Cerebellum and Adaptive Control. Cambridge University Press 2002:3–5.
49. Voogd J. The human cerebellum. J Chem Neuroanat 2003;26:243-52.
50. Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. New roles for the cerebellum in health and disease. Frontiers in Systems Neuroscience 2013;7:1-11.
51. Vilensky JA, Damasio AR, Maurer RG. Gait disturbances in patients with autistic behavior: a preliminary study. Arch Neurol 1981;646-9.
52. Gillig P, Sanders RD. Psychiatry, neurology, and the role of the cerebellum. . Psychiatry (Edgmont) 2010;7:38.
53. Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, et al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. Cerebellum 2012;11:777-807.
54. Varambally Sillitoe VR, Joyner AL. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. Rev Cell Dev Biol 2007;23:549-77.
55. Hoppenbrouwers SS, Schutter DJLG, Fitzgerald PB, Chen R, Daskalakis ZJ. The role of the cerebellum in the pathophysiology and treatment of neuropsychiatric disorders: a review. . Brain Res Rev 2008:185-200.
56. Chamberlain SR RT, Sahakian BJ. The neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. . Biol Psychiatry 2007:1317-9.
57. DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, et al. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. . J Neurosci 2006;26:6897-906.
58. Jaeger E. Avaliação do crescimento somático do cerebelo de pré-termos de muito baixo peso realizada pela medida do diâmetro transverso cerebelar. Porto Alegre.: faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
59. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammation response. . Best Pract ResClin Anaesthesiol 2004;18: 385-405.
60. Jacobs AH, Tavitian B, Consortium I. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2012;32:1393-415.
61. Mizobe-Ono L, Araújo JLPd, dos-Santos MC. Componentes da Imunidade Inata e Adaptativa Presentes na Saliva Humana. Revista de Odontologia da UNESP 2006;35.

62. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS letters* 2011;585:3798-805.
63. Stigger FdS. Estudo funcional e morfológico da associação de lipopolissacarídeo, anóxia e restrição sensório-motora em ratos: Implicações para um modelo animal de paralisia cerebral. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2010.
64. Stolp H, Dziegielewska K. Role of developmental inflammation and blood–brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathology and applied neurobiology* 2009;35:132-46.
65. Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson’s disease. *Neurochemistry international* 2013;62:803-19.
66. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular medicine reports* 2016;13:3391-6.
67. Schwartz M, Kipnis J, Rivest S, Prat A. How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013;33:17587-96.
68. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 2014;158:15-24.
69. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 2010;119:7-35.
70. Sullivan SM, Bjorkman ST, Miller SM, Colditz PB, Pow DV. Morphological changes in white matter astrocytes in response to hypoxia/ischemia in the neonatal pig. *Brain Res* 2010;1319:164-74.
71. Eddleston; M, Mucke. L. Molecular profile of reactive astrocytes- implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993;54:15-36.
72. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics* 2007;45:27-37.
73. Lull; ME, Block. ML. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2010;7:354–65.
74. More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY, Choi DK. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators of inflammation* 2013;2013:952375.
75. Wixey JA, Chand KK, Colditz PB, Bjorkman ST. Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. *Placenta* 2017;54:117-24.

76. Fiers W. Precursor structures and structure-function analysis of TNF and lymphotoxin. *Immunol Ser* 1992;79-92.
77. Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, et al. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *J Photochem Photobiol B* 2009;97:145-51.
78. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:119-30.
79. Lu Y, He M, Zhang Y, et al. Differential pro-inflammatory responses of astrocytes and microglia involve STAT3 activation in response to 1800 MHz radiofrequency fields. *PloS one* 2014;9:e108318.
80. Pierce JD, Cackler AB, Arnett MG. Why should you care about free radicals? Because these molecules appear to play a role in the development of heart disease, cancer, diabetes, and other diseases. Understanding how free radicals form and what you can do to help keep them in balance is essential to maximizing the care you provide now--and in the future. *Rn* 2004;67:38-44.
81. Halliwell B. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine* 2007:187-267.
82. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95.
83. Jackson L, Schisterman E, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Human reproduction* 2005;20:2014-20.
84. Kamata H, Hirata H. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell Signal* 1999;11:1–14.
85. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research* 1995;15:755-71X.
86. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine* 2001;30:1191-212.
87. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006;8.
88. Floyd RA. Antioxidants, Oxidative Stress, and Degenerative Neurological Disorders. *Experimental Biology and Medicine* 1999;222:236-45.
89. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004;10 Suppl:S18-25.
90. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet* 1994;344:721-4.

91. Perrone S, Tataranno LM, Stazzoni G, Ramenghi L, Buonocore G. Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2015;28 Suppl 1:2291-5.
92. Wilhelm J, Vytasek R, Uhlik J, Vajner L. Oxidative Stress in the Developing Rat Brain due to Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016;2016:5057610.
93. Pohanka M. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia microbiologica* 2013;58:503-13.
94. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009;8:382–97.
95. Meyer U, Feldon J, Yee BK. A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 2009;35:959-72.
96. Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Annals of neurology* 2012;71:444-57.
97. Organization WH. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. World Health Organization 2015.
98. Bittar RE, Zugaib M. Indicadores de risco para o parto prematuro. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;31:203-9.
99. Almeida TSO, Lins RP, Camelo AL, Mello D. Investigação sobre os Fatores de Risco da Prematuridade: uma Revisão Sistemática. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 2013;17:301-8.
100. Peterson BS, Vohr B, Staib LH, et al. Regional Brain Volume Abnormalities and Long-term Cognitive Outcome in Preterm Infants. *JAMA* 2000;284.
101. Nosarti C, Nam KW, Walshe M, et al. Preterm birth and structural brain alterations in early adulthood. *NeuroImage Clinical* 2014;6:180-91.
102. Wolke D. Environmental neonatology. *Archives of disease in childhood* 1987;62:987.
103. Smith GC, Gutovich J, Smyser C, et al. Neonatal intensive care unit stress is associated with brain development in preterm infants. *Annals of neurology* 2011;70:541-9.
104. Souza DFd. Neuroinflamação e esquizofrenia: Avaliação de parâmetros astrogliais in vitro e in vivo. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

105. McAdams; RM, Juul. SE. Cerebral Palsy: Prevalence, Predictability, and Parental Counseling. *NeoReviews* 2011;12.
106. Airolidi MJ, Silva SBdC, Souza CTd. Avaliação de recém nascidos pré-termo com hemorragia peri-intraventricular e/ou leucomalácia periventricular. *Rev Neurocienc* 2009;17:24-9.
107. Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 2000;47.
108. Brown AS. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 2006;32:200-2.
109. Pardo CA, Eberhart CG. The neurobiology of autism. *Brain pathology* 2007;17:434-47.
110. Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, et al. Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell and tissue research* 2005;320:369-78.
111. Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, et al. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr Res* 2006;59:428-33.
112. Fan LW, Pang Y, Lin S, Rhodes PG, Cai Z. Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 2005;133:159-68.
113. Meyer U, Nyffeler M, Engler A, et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006;26:4752-62.
114. Shi L, Smith SE, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, behavior, and immunity* 2009;23:116-23.
115. Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005;25:8000-9.
116. Wang J, He C, Wu WY, et al. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2015;138:96-103.
117. Volpe JJ. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J Child Neurol* 2009;24:1085-104.

118. Omotoso GO, Babalola FA. Histological changes in the cerebelli of adult wistar rats exposed to cigarette smoke. *Niger J Physiol Sci* 2014.
119. Karrow N. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine–immune axis during fetal and neonatal development: Lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and immunity* 2006;20:144-58.
120. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the homotypic stress-induced suppression of LH secretion in adulthood in male rat. *International journal of developmental neuroscience* 2009;27:345-9.
121. Xie D, Shen F, He S, Chen M. et al. IL-1b Induces Hypomyelination in the Periventricular White Matter Through Inhibition of Oligodendrocyte Progenitor Cell Maturation via FYN/MEK/ERK Signaling Pathway in Septic Neonatal Rats. *Glia* 2016; 64: 583-602.
122. Pinto WBvdr, Ko GM. Teste de rotarod: Contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. *RESBCAL* 2012;1:202-12.
123. de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* 2005;40:506-11.
124. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia brasileira de Ciências* 2003;75:469-86.
125. Gundersen HJG, Jensen EBV, U KK, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *Journal of Microscopy* 1999;193:199–211.
126. Larsen JO, Skalicky M, Viidik A. Does Long-Term Physical Exercise Counteract Age-Related Purkinje Cell Loss? A Stereological Study of Rat Cerebellum. *The Journal Of Comparative Neurology* 2000;428:213–22.
127. Perez-Pouchoulen M, VanRyzin JW, McCarthy MM. Morphological and Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum. *eNeuro* 2015;2.
128. Nairn JG, Bedi KS, Mayhew TM, Campbell LF. On the Number of Purkinje Cells in the Human Cerebellum: Unbiased Estimates Obtained by Using the "Fractionator". *The Journal of Comparative Neurology* 1989:527-32.
129. Calio ML, Marinho DS, Ko GM, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. *Free radical biology & medicine* 2014;70:141-54.

130. Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C, Demaison L, Rochette L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free radical biology & medicine* 2006;40:2214-22.
131. Staib-Lasazik I, Kriege O, Timaru-Kast R, et al. Anesthesia for Euthanasia Influences mRNA Expression in Healthy Mice and after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 2014;31:1664–71.
132. Shi X-X, Yin B-S, Yang P, et al. Xylazine Activates Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Pathway in the Central Nervous System of Rats. *PloS one* 2016.
133. Bossù P, Cutuli D, Palladino I, et al. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. *Journal of Neuroinflammation* 2012;9:101.
134. Benatti C, Alboni S, Capone G, et al. Early neonatal inflammation affects adult pain reactivity and anxiety related traits in mice: genetic background counts. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2009;27:661-8.
135. Li X, Kinsey-Jones J, Knox A, et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood. *Endocrinology* 2007;148:5984-90.
136. Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behavioural brain research* 2009;205:355-9.
137. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation* 2015;12:82.
138. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell death & disease* 2014;5:e1102.
139. Weber MD, Frank MG, Tracey KJ, Watkins LR, Maier SF. Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2015;35:316-24.
140. Andersen ML, Tufik S. Rats. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. São Paulo 2010.
141. Cohen J, Bridges RS. Retention of Maternal Behavior in Nulliparous and Primiparous Rats: Effects of Duration of Previous Maternal Experience. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1981;95:450-9.
142. Lunardelli A, Luft C, Pedrazza L, Donadio MVF. Efeitos de longo prazo do estresse neonatal com lipopolissacarídeo em ratos. *Ciência & Saúde* 2014;7: 47-53.

143. Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R581-9.
144. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, et al. Neonatal LPS injection alters the body weight regulation systems of rats under non-stress and immune stress conditions. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2010;28:119-24.
145. Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2007;293:R581-R9.
146. Imosemi IO. The Role of Antioxidants in Cerebellar Development. A Review of Literature. *Int J Morphol* 2013;31:203-10.
147. Correa F, Ljunggren E, Patil J, et al. Time-dependent effects of systemic lipopolysaccharide injection on regulators of antioxidant defence Nrf2 and PGC-1alpha in the neonatal rat brain. *Neuroimmunomodulation* 2013;20:185-93.
148. Lopez IA, Acuna D, Beltran-Parrazal L, et al. Evidence for oxidative stress in the developing cerebellum of the rat after chronic mild carbon monoxide exposure (0.0025% in air). *BMC Neuroscience* 2009 2009;10.
149. MacRae M, Macrina T, Khoury A, Migliore MM, Kentner AC. Tracing the trajectory of behavioral impairments and oxidative stress in an animal model of neonatal inflammation. *Neuroscience* 2015;298:455-66.
150. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002;68:325-40.
151. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology* 2006;147 Suppl 1:S232-40.
152. Lin L, Desai R, Wang X, Lo EH, Xing C. Characteristics of primary rat microglia isolated from mixed cultures using two different methods. *J Neuroinflammation* 2017;14:101.
153. Pang Y, Dai X, Roller A, et al. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. *PloS one* 2016;11:e0164403.
154. Falck M, Osredkar D, Wood TR, et al. Neonatal Systemic Inflammation Induces Inflammatory Reactions and Brain Apoptosis in a Pathogen-Specific Manner. *Neonatology* 2018;113:212–20.
155. di Penta A, Moreno B, Reix S, et al. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PloS one* 2013;8:e54722.

156. Nakki R, Koistinaho J, Sharp FR, Sagar SM. 1995. Cerebellar toxicity of phencyclidine. *J Neurosci* 1995;20:97–108.
157. Cutando L, Busquets-Garcia A, Puighermanal E, et al. Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure. *J Clin Invest* 2013;123:2816-31.
158. Wang KC, Fan LW, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, Tien LT. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* 2013;27:146–57.
159. Zhu F, Zhang L, Ding YQ, Zhao J, Zheng Y. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain, behavior, and immunity* 2014;38:166-74.
160. Qin L, Wu X, Bloco ML, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007;453–62.
161. Marzzani SHS. Parâmetros relacionados à depressão em animais adultos submetidos à ativação imune neonatal. Palhoça: Universidade do Sul De Santa Catarina; 2018.
162. Christensen LB, Woods TA, Carmody AB, Caughey B, Peterson KE. Age-related differences in neuroinflammatory responses associated with a distinct profile of regulatory markers on neonatal microglia. *Journal of Neuroinflammation* 2014.
163. Weberpals M, Hermes M, Hermann S, et al. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci* 2009;29:14177-84.
164. Püntener U, Booth SG, Perry VH, Teeling JL. Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Journal of Neuroinflammation* 2012;9.
165. Catre D, Lopes MF, Cabrita AS. Lasting developmental effects of neonatal fentanyl exposure in preweanling rats. *Anesthesiol Res Pract* 2012;2012:180124.
166. Walker AK, Nakamura T, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats. *Stress* 2010;13:506-15.
167. Chen W-JA, Edwards RB. Prenatal nicotine exposure does not cause Purkinje cell loss in the developing rat cerebellar vermis. *Neurotoxicology and Teratology* 2003;25:633-7.
168. Cai Z, Fan L-W, Kaizaki A, et al. Neonatal systemic exposure to lipopolysaccharide enhances susceptibility of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. *Developmental neuroscience* 2013;35:155-71.

169. Zhu F, Zhang L, Ding Y-q, Zhao J, Zheng Y. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain, behavior, and immunity* 2014;38:166-74.
170. Lan K-M, Tien L-T, Pang Y, Bhatt AJ, Fan L-W. IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicology letters* 2015;234:30-9.
171. Bauer-Moffett CAJ. The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. *Brain Res Rev* 1977;119:249-68.
172. Hutton LC, Castillo-Melendez M, Walker DW. Uteroplacental inflammation results in blood brain barrier breakdown, increased activated caspase 3 and lipid peroxidation in the late gestation ovine fetal cerebellum. *Dev Neurosci* 2007;29:341–54.
173. Yan E C-MM, Nicholls T, Hirst J, Walker D. Cerebrovascular responses in the fetal sheep brain to low-dose endotoxin. . *Pediatr Res* 2004;55:855–63.
174. Lafarga M, Berciano MT, Blanco M. Ectopic Purkinje Cells in the Cerebellar White Matter of Normal Adult Rodents: A Golgi Study. *Cells Tissues Organs* 1986;127:53-8.
175. Castagna C, Merighi A, Lossi L. Cell death and neurodegeneration in the postnatal development of cerebellar vermis in normal and Reeler mice. *Ann Anat* 2016;207:76-90.
176. Beckinghausen J, Sillitoe RV. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neuroscience letters* 2019; 688: 2-13.
177. Leto K, Arancillo M, Becker EB, et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum* 2016;15:789-828.
178. Miyata T, Ono Y, Okamoto M, et al. Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Dev* 2010;5:23.
179. Rahimi-Balaei M, Bergen H, Kong J, Marzban H. Neuronal Migration During Development of the Cerebellum. *Frontiers in cellular neuroscience* 2018;12:484.
180. Nakamura K, Beppu M, Kaori Sakai, et al. The c-terminal region of reelin is necessary for proper positioning of a subset of purkinje cells in the postnatal cerebellum. *Neuroscience* 2016.
181. Darmanto W, Inouye M, Takagishi Y, Ogawa M, Mikoshiba K, Murata Y. Derangement of Purkinje Cells in the Rat Cerebellum Following Prenatal Exposure to X-Irradiation: Decreased Reelin Level Is a Possible Cause. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2000;59:251-62.

182. Roberson R, Woodard JE, Toso L, Abebe D, Poggi SH, Spong CY. Postnatal inflammatory rat model for cerebral palsy: too different from humans. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1038-44.
183. Rico JLR, Ferraz DB, Ramalho-Pinto FJ, Morato S. Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats *Behav Brain Res* 2010;215:102–9.
184. Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sebire G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience* 2009;158:673-82.
185. Bernardi MM, Teixeira LP, Ligeiro-de-Oliveira AP, Tavares-de-Lima W, Palermo-Neto J, Kirsten TB. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces sexually dimorphic sickness behavior in adult rats. *Psychology & Neuroscience* 2014;7:113 - 23.
186. Tenk CM, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2008;26:331-8.
187. Vojtechova I, Petrasek T, Maleninska K, et al. Neonatal immune activation by lipopolysaccharide causes inadequate emotional responses to novel situations but no changes in anxiety or cognitive behavior in Wistar rats. *Behavioural brain research* 2018;349:42-53.

8. ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos da inflamação sistêmica no período neonatal sobre o cerebelo na vida adulta.", protocolada sob o CEUA nº 9781020317 (ID 005559), sob a responsabilidade de **Jaime Moreira Pires e equipe; Luiz Eugênio Araujo de Moraes Mello; Ana Teresa Figueiredo Stochero Leslie; Débora da Silva Bandeira; Clivandir Severino da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 26/04/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the effects of systemic inflammation in the neonatal period on the cerebellum in adult life.", utilizing 64 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 9781020317 (ID 005559), under the responsibility of **Jaime Moreira Pires and team; Luiz Eugênio Araujo de Moraes Mello; Ana Teresa Figueiredo Stochero Leslie; Débora da Silva Bandeira; Clivandir Severino da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/26/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **09/2018**

Área: **Neurologia E Neurociências**

Origem: **Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 1 dias**

N: **64**

Linhagem: **Wistar norvegicus**

Peso: **7 a 9 g**

Local do experimento: As primeiras manipulações dos animais, para pesagem, aplicação do LPS e todos os procedimentos seguintes até o desmame desses animais será feito nas dependências do CEDEME. A segunda parte dos experimentos, como perfusão, cortes do material no criostato e as imunofluorescências serão realizadas no Laboratório de Neurobiologia, localizado no Edifício de Pesquisas II da UNIFESP.

São Paulo, 03 de setembro de 2019

Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo